

AD

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 7 月 18 日 (18.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/055708 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/31, 9/10,
9/42, 1/21, C12P 19/00 // A23L 1/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00052

(22) 国際出願日: 2002 年 1 月 9 日 (09.01.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-5441 2001 年 1 月 12 日 (12.01.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 Okayama (JP).

(KUBOTA, Michio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 丸田 和彦 (MARUTA, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 山本 拓生 (YAMAMOTO, Takuo) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 福田 恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久保田 倫夫

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING α -ISOMALTOSYLGLUCOSACCHARIDE SYNTHASE ACTIVITY(54) 発明の名称: α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド(57) Abstract: It is intended to provide a polypeptide usable in producing a cyclic tetrasaccharide having a cyclo{ \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow) structure, a DNA encoding this polypeptide and use of the same. This object is achieved by establishing a polypeptide capable of transferring α -glucosyl from a saccharide having an α -1,4-glycosyl bond as a binding manner at the non-reducing end and showing a degree of glucose polymerization of 2 or above to thereby synthesizing a saccharide having an α -1,6-glycosyl binding manner as a binding manner at the non-reducing end and an α -1,4-glycosyl bond as a binding manner other than at the non-reducing end and showing a degree of glucose polymerization of 3 or above without substantially elevating the reducing intensity; a DNA encoding this polypeptide; a replicable recombinant DNA containing the DNA encoding the above polypeptide and an autonomously replicable vector; a transformant constructed by transferring this recombinant DNA into an appropriate host; a process for producing the polypeptide; and use thereof.

[続葉有]



WO 02/055708 A1



(57) 要約:

本発明は、サイクロ $\{\rightarrow 6\} - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow)$ の構造を有する環状四糖の製造に用いることのできるポリペプチド、及び当該ポリペプチドをコードするDNAとその用途を提供することを課題とし、非還元末端の結合様式として $\alpha - 1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として $\alpha - 1, 6$ グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha - 1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードするDNA、当該ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA、当該組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体、当該ポリペプチドの製造方法とその用途を確立することにより前記課題を解決する。

明 細 書

α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド

5 技術分野

本発明は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド（以下、特に断りがない限り、「本発明のポリペプチド」と言う。）及び遺伝子組換え技術による当該ポリペプチドの製造方法とその用途に関する。

10

背景技術

グルコースを構成糖とする糖質、例えば、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物としては、アミロース、アミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などが知られている。これら

15 これらの糖質は、通常、分子の両端のいずれか一方が非還元末端で他方が還元末端であり、還元性を示すことが知られている。一般に、澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・イクイバレント（Dextrose Equivalent = DE）として表される。この値の大きいものは、通常、低分子、低粘度、甘味で、反応性が強く、アミノ

20 酸や蛋白質などのアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起し易く、褐変して悪臭を発生し、得られる製品の品質を劣化し易いとの欠点があることが知られている。斯かる欠点を改善するために、澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減、若しくは消滅させる方法が古くから望まれていた。例えば、『ジャーナル・オブ・

25 アメリカン・ケミカル・ソサイエティー（Journal of American Chemical Society）』、第71巻、353乃

至 358 頁 (1949 年) に開示されているように、澱粉にマセランス アミラーゼ (macerans amylase) を作用させることにより、6 乃至 8 分子のグルコースが α -1, 4 グルコシル結合した α -、 β -または γ -環状デキストリンを生成させる方法が知られている。現在では、
5 澱粉からこれら環状デキストリンが工業的規模で生産され、それらが有する非還元性、無味性、包接能などの特性を生かして、各種用途に利用されている。また、先に、本出願人が、特開平 7-143876 号公報及び特開平 7-213283 号公報などに開示したように、マルトオリゴ糖などの澱粉部分分解物に、非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を
10 作用させることにより、2 分子のグルコースが α 、 α -結合したトレハロースを生成させる方法も知られている。現在では、このトレハロースは澱粉から工業的規模で生産され、その非還元性で、温和で高品質な甘味特性などを生かしての用途に利用されている。このように、グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、グルコース重合度が 2 の α 、 α -トレハロース、グルコース重合度が 6 乃至 8 の α -、 β -、 γ -環状デキストリン
15 が工業的規模で生産され、それらの特性を生かして各種用途に利用されているものの、斯かる非還元性糖質の種類には限りがあり、更に多種多様な非還元性糖質乃至低還元性糖質の確立が待たれている。

一方、近年、グルコースを構成糖とする新たな環状の四糖類が報告された。即ち、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第 226 巻、641 乃至 648 (1994 年) には、主として、グルコース残基が α -1, 3 結合と α -1, 6 結合とが交互に連なっているアルテルナン (alternan) に、加水分解酵素アルテルナナーゼ (alternanase)
20 を作用させることにより、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)
25

— α —D—グルコピラノシル—(1 \rightarrow 3)— α —D—グルコピラノシル—
(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖(本明細書では特に断らない限り、本糖質を「環状四糖」と略称する。)が生成し、これをメタノール共存下で晶出させることが示されている。

- 5 斯かる環状構造を有する環状四糖は、非還元性の糖質で、包接能を示し、揮発性有機物を安定化する作用やアミノカルボニル反応を起こさず、褐変、劣化を懸念することなく、各種用途に利用、加工できるものと期待されている。

- しかしながら、環状四糖の製造に必要な原料のアルテルナンや酵素のアルテルナナーゼの入手が困難であるばかりでなく、斯かる酵素を産生する微生物も容易に入手できる状態にはない。

- 10 斯かる状況下、本発明者等は、先に、国際特許出願公開第 WO 01 / 90338 A1 号で開示したように、非還元末端の結合様式として、 α -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質
15 (本明細書においては、本糖質を「 α -イソマルトシルグルコ糖質」と略称することもある。)を原料とし、これに、本糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断し、この α -イソマルトシル部分を転移して環状四糖を生成する α -イソマルトシル転移酵素を作用させて、環状四糖を生成させることに成功した。この α -イソマルトシル
20 転移酵素は、 α -イソマルトグルコ糖質から α -イソマルトシル転移することによって環状四糖を生成する酵素であって、詳細には、下記の理化学的性質を有する α -イソマルトシル転移酵素である。

(1) 作用

- 25 非還元末端の結合様式として α -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコ

ース重合度が3以上の糖質から、 α -イソマルトシル転移することによって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシル - $(1 \rightarrow 3)$ - α -D-グルコピラノシル - $(1 \rightarrow 6)$ - α -D-グルコピラノシル - $(1 \rightarrow 3)$ - α -D-グルコピラノシル - $(1 \rightarrow)$ の構造を有する環状四糖を生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約82,000乃至約136,000ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 pI 約3.7乃至約8.3の範囲に等電点を有する。

(4) 至適温度

pH 6.0、30分間反応の反応条件下、約45乃至約50℃の温度範囲内に至適温度を有する。

(5) 至適 pH

35℃、30分間反応の反応条件下、 pH 約5.5乃至約6.5の温度範囲内に至適 pH を有する。

(6) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持する条件において、約45℃以下に温度安定域を有する。

(7) pH 安定性

4℃、24時間保持する条件下、 pH 約3.6乃至約10.0の範囲内に安定 pH 域を有する。

しかしながら、環状四糖の原料糖質についてみると、豊富で安価に供給される澱粉からの生産が望まれるものの、実際には、 α -イソマルトシル転移酵素が澱粉に直接作用しないことから、予め、澱粉を前述の特定構造

を有する α -イソマルトシルグルコ糖質、例えば、パノースやイソマルトシルマルトースなどの比較的 low 分子のイソマルトオリゴ糖に変換させ、次いで、これに α -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる手法が採用されている。一方、原料からの環状四糖の収率についてみると、パノースを用いる場合、原料パノース重量当たりの収率は約 44% である。同様に、イソマルトシルマルトースを用いる場合の収率は、約 31% であるのに対して、澱粉を用いる場合には、予め、 α -アミラーゼ、澱粉枝切り酵素、 β -アミラーゼ及び α -グルコシダーゼなどを作用させてパノースなどの比較的 low 分子のイソマルトオリゴ糖を生成させる必要があるだけでなく、環状四糖の収率も約 15% と極めて低いことが判明している。澱粉からの環状四糖の生産は、このように低い生成率でも可能であるものの、コスト高が懸念され、澱粉を原料として、環状四糖の収率を向上させた新規製造方法の確立が望まれていた。

斯かる状況下、本発明者等は、澱粉を原料とし、澱粉から環状四糖の収率を著しく向上させることのできる α -イソマルトシルグルコ糖質を生成する新規な酵素に期待を込めて、微生物を広く検索してきた。その結果、意外にも、国際特許出願公開第 WO 01/90338 A1 号で開示した土壌からの分離菌バチルス (*Bacillus*) 属およびアルスロバクター (*Arthrobacter*) 属に属する α -イソマルトシル転移酵素産生微生物 C9 株、C11 株、N75 株および A19 株が、新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をも併せて産生することを見出し、澱粉部分分解物をはじめとする比較的高分子のグルコ糖質に、この新規 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを作用させることにより、目指していた環状四糖の収率を著しく向上させることのできることを見出し、この α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の諸性質を明らかにすると共に、その製造方法を確立し、更には、当

該酵素による α -グルコシル転移反応方法、 α -イソマルトシルグルコ糖質の製造方法、及び当該酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを併用した環状四糖又はこれを含む糖質及びその製造方法、併せて、これら方法により得られる環状四糖、又はこれを含む糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立した。しかしながら、これら微生物は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能が充分でなく、 α -イソマルトシルグルコ糖質や環状四糖を大規模に製造する場合、斯かる当該酵素の供給源としての微生物を大量に培養しなければならないという問題がある。

この点、今日では分子生物学が進展し、酵素の本質がポリペプチドであり、それを構成するアミノ酸配列がその酵素活性の発現を左右するものであり、そのアミノ酸配列は、遺伝子DNAに暗号化されていることが知られている。したがって、ポリペプチドをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、そのポリペプチドをコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを適宜微生物や動植物細胞に導入し、得られる形質転換体を適宜栄養培地中で培養することにより、比較的容易に所望量のポリペプチドが取得できるようになった。斯かる状況に鑑み、上記酵素の本質であるポリペプチドをコードする遺伝子を突き止め、その塩基配列を解明するのが急務となっている。

20 発明の開示

本発明の第一の目的は、非還元末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有す

るポリペプチドを創製することである。

本発明の第二の目的は、前記ポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

5 本発明の第三の目的は、前記DNAを含む複製可能な組換えDNAを提供することにある。

本発明の第四の目的は、前記組換えDNAを導入した形質転換体を提供することにある。

10 本発明の第五の目的は、前記形質転換体を用いる、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの製造方法を提供することにある。

本発明の第六の目的は、前記ポリペプチドの用途を提供することにある。

本発明は、前記第一の目的を下記の理化学的性質を有する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドにより解決するものである。

15 (1) 作用非還元末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として α -1, 6グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する。
20

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約74,000乃至約160,000ダルトンの範囲内に分子量を有する。

25 (3) 至適温度

pH 6.0、60分間反応の条件下、約40乃至約50℃の温度範囲内

に至適温度を有する。

pH 6.0、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約45乃至約55℃の温度範囲内に至適温度を有する。

pH 8.4、60分間反応の条件下、60℃に至適温度を有する。また
5 は、

pH 8.4、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約65℃に至適温度を有する。

(4) 至適 pH

35℃、60分間反応の条件下、pH約6.0乃至約8.4の温度範囲
10 内に至適pHを有する。

(5) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持する条件下、約45℃以下に温度安定域を有する。

pH 6.0、60分間保持する条件において、1mM Ca^{2+} 存在下、約6
15 0℃以下に温度安定域を有する。

pH 8.0、60分間反応の条件下、55℃以下に温度安定域を有する。
または、

pH 8.0、60分間保持する条件において、1mM Ca^{2+} 存在下、約60℃以下に温度安定域を有する。

20 (6) pH安定性

4℃、24時間保持する条件下、pH約5.0乃至約10.0の範囲内に安定pH域を有する。

本発明は、前記第二の目的を、上記ポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

25 本発明は、前記第三の目的を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能なDNAにより解決するも

のである。

本発明は、前記第四の目的を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

- 5 本発明は、前記第五の目的を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物からポリペプチドを採取してなるポリペプチドの製造方法により解決するものである。

- 10 本発明は、前記第六の目的を、前記ポリペプチドの種々の用途を確立することにより解決するものである。

図面の簡単な説明

- 第1図は、マルトテトラオースに α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを作用させたときに生成する生成物Xの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。
- 15

第2図は、マルトペンタオースに α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを作用させたときに生成する生成物Yの ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

- 第3図は、マルトテトラオースに α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを作用させたときに生成する生成物Xの ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。
- 20

第4図は、マルトペンタオースに α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを作用させたときに生成する生成物Yの ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

- 25 第5図は、バチルス グロビスポルスC11株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第6図は、バチルス グロビスポルス N75 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第7図は、アルスロバクター グロビホルミス A19 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第8図は、バチルス グロビスポルス C9 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第9図は、バチルス グロビスポルス N75 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

10 第10図は、アルスロバクター グロビホルミス A19 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第11図は、本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

15 第12図は、バチルス グロビスポルス N75 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

第13図は、アルスロバクター グロビホルミス A19 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

20 第14図は、バチルス グロビスポルス C11 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

第15図は、バチルス グロビスポルス N75 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

第16図は、アルスロバクター グロビホルミス A19 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

25 第17図は、本発明による組換え DNA 『pBGC2』の制限酵素地図を示す図である。図中、黒い太線で示した部分は、バチルス グロビスポ

ルスC11由来の本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAである。

第18図は、本発明による組換えDNAの『pBGN2』の制限酵素地図を示す図である。図中、黒い太線で示した部分は、バチルス グロビス
5 ポルスN75由来の本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAである。

第19図は、本発明による組換えDNAの『pAGA1』の制限酵素地図を示す図である。図中、黒い太線で示した部分は、アルスロバクター グロビホルミスA19株由来の本発明の α -イソマルトシル転移酵素活性を
10 有するポリペプチドをコードするDNAである。

発明を実施するための最良の形態

本発明のポリペプチドとは、非還元末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実
15 質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として α -1, 6結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する酵素活性を有するポリペプチド全般を意味する。本発明のポリペプチドは、通常、解明されたアミノ酸配列を有しており、その一例
20 としては、例えば、配列表に於ける配列番号1に示すアミノ酸配列、若しくはそのアミノ酸配列に於いて、1若しくは複数個のアミノ酸、即ち、1個又は2個以上、場合によっては、1乃至50個、或いは、1乃至30個、若しくは、1乃至10個のアミノ酸が欠失したり、他のアミノ酸で置換されたり、更には付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを例示する
25 ことができる。尚、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地成分、組成や培養温度、

pHなどのよって、宿主内外酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の理化学的性質は保持しているものの、配列表に於ける配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端付近のアミノ酸が1若しくは複数個、即ち、1個又は2個以上、場合によっては、1乃至50個、1乃至30個、
5 或いは、1乃至20個、若しくは、1乃至10個欠失したり、他のアミノ酸と置換されたり、更にはN末端に1個または2個以上、場合によって、1乃至30個、或いは、1乃至20個、若しくは、1乃至10個のアミノ酸が新たに付加した変異体が生成することがある。斯かる変異体であっても、それが所期の理化学的性質を具備している限り、当然、本発明のポリペプチドに包含されることは言うまでもない。
10

本発明のポリペプチドは、本発明のDNAを適宜宿主に導入し、得られる形質転換体の培養液から採取することができる。本発明で使用する形質転換体としては、例えば、配列表における配列番号4、5、又は6に示す5'末端からの塩基配列若しくは、それらの塩基配列において、1若しくは
15 複数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加した塩基配列、または、それらに相補的な塩基配列若しくはそれらの塩基配列における1若しくは複数個を、遺伝子の縮重に基づき、それがコードするアミノ酸配列を変えることなく他の塩基で置換した塩基配列からなるDNAを含む形質転換体を例示できる。また、上記塩基配列として、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1若しくは複数個、即ち、
20 1個または2個以上、場合によっては、1乃至150個、1乃至90個、或いは1乃至60個、若しくは、1乃至30個を他の塩基で置き換えたものを例示できる。

本発明のDNAは、本発明のポリペプチドをコードする塩基配列である
25 限り、天然由来のものであろうと、人為的に合成されたものであろうとその由来は問わない。天然の給源としては、例えば、平成12年4月25日

付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政
法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、受託番号 F E R M
B P - 7 1 4 3 として寄託されているバチルス グロビスポルス C 9 株、
平成12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中
5 央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、
受託番号 F E R M B P - 7 1 4 4 として寄託されているバチルス グロ
ビスポルス C 1 1 株、及び平成13年5月16日付で、日本国茨城県つく
ば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所
特許生物寄託センターに、受託番号 F E R M B P - 7 5 9 1 として寄託
10 されているバチルス グロビスポルス N 7 5 株を含むバチラス属、または、
平成13年5月16日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中
央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、
受託番号 F E R M B P - 7 5 9 0 として寄託されているアルスロバクタ
ー・グロビホルミス A 1 9 株を含むアルスロバクター属の微生物が挙げら
15 れる。これら微生物の菌体からはこの発明の D N A を含む遺伝子が得られ
る。すなわち、斯かる微生物を栄養培地に接種し、好氣的条件下で約1乃
至約3日間培養後、培養物から菌体を採取し、リゾチームや β -グルカナ
ーゼなどの細胞壁溶解酵素や超音波で処理することにより当該 D N A を含
む遺伝子を菌体外に溶出させる。この際、プロテアーゼなどの蛋白質分解
20 酵素を用いたり、S D S などの界面活性剤の存在下で凍結融解することも
できる。斯くして得られる処理物に、例えば、フェノール抽出、アルコー
ル沈殿、遠心分離、リボヌクレアーゼ処理など斯界に於ける通常一般の方
法を適用することにより目的の D N A を得ることができる。一方、本発明
の D N A を人為的に合成するには、例えば、配列表に於ける配列番号4、
25 5、又は6に示す塩基配列に基づいて化学合成すればよい。又、当該 D N
A を含む遺伝子を鋳型として、適当なプライマーとなる得る化学合成 D N

Aを用いて、PCR合成することも有利に実施できる。

これらDNAを用いて本発明のポリペプチドを工業的に大量に、安価にかつ容易に製造することができる。即ち、当該DNAを、通常、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入し、得られる形質転換体を適宜栄養培地中で培養し、その培養物から菌体5を採取し、その菌体から当該DNAを含む組換えDNAを得、これを、通常、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換し、得られる形質転換体を適宜栄養培地中で培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。前記組換えDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAが入手できさえすれば、通常一般の組換えDNA10技術により比較的容易に調製することができる。又、前記ベクターとしては、例えば、pBR322、pUC18、Bluescript I I SK(+)、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7などのプラスミドベクターや λ gt \cdot λ C、 λ gt \cdot λ B、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105などのファージベクターが挙げられる。このうち、本発明のDNAを大腸菌で発現させるには、pBR322、pUC18、Bluescript I I SK(+)、 λ gt \cdot λ C及び λ gt \cdot λ Bが好適であり、一方、枯草菌で発現させるには、pUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1及び ϕ 105が好適である。pHV14、TRp7、YEp7及びpBS7は、組換えDNAを二種以上の宿主20主内で複製させる場合に有用である。

本発明に係るDNAを前記ベクターに挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、DNAを含む遺伝子と自律複製可能なベクターとを制限酵素及び／又は超音波により切断し、次に、25 生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I型の制

- 限酵素、詳細には、*Sau 3A I*、*Eco R I*、*Hind I I I*、*Bam H I*、*Sal I*、*Xba I*、*Sac I*、*Pst I*などを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易である。必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガー
- 5 ゼを作用させればよい。斯くして得られる組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等の適宜宿主に導入して形質転換体とし、これら形質転換体から所望の形質転換体をクローニングし、これを培養することにより容易かつ大量に複製可能である。前記クローニングに際しては、コロニー
- 10 ハイブリダイゼーション法を適用するか、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含む栄養培地で培養し、該糖質より、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ 結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する形質転換体を選択すればよい。
- 15 これらクローニングにより得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体内外に当該ポリペプチドを産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、ト
- 20 レハロースなどの糖源が、又、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度20乃至40℃、pH 2乃至10に保ちつつ、通気攪拌などによる好氣的条件下で約1乃至
- 25 約6日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物は本発明のポリペプチドを含む粗ポリペプチドとしてそのまま使用可

能であるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、浸透圧ショックや界面活性剤により菌体から抽出したり、超音波や細胞溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより本発明のポリペプチドを菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には斯界に於いてポリペプチドを精製するために用いられる通常の方法が採用でき、例えば、菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に濃縮、塩析、透析、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などから選ばれる1種又は2種以上の方法を適宜組合わせて適用すればよい。

10 本発明のポリペプチドは、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が
15 3以上の糖質を生成する酵素活性を有しており、詳細には、下記の理化学的性質を有する。

(1) 作用

非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -
20 グルコシル転移することによって、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する

(2) 分子量

S D S -ゲル電気泳動法により、約74,000乃至約160,000
25 ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(3) 至適温度

pH 6.0、60分間反応の条件下、約40乃至約50℃の温度範囲内に至適温度を有する。

pH 6.0、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約45乃至約55℃の温度範囲内に至適温度を有する。

- 5 pH 8.4、60分間反応の条件下、60℃に至適温度を有する。または、

pH 8.4、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約65℃に至適温度を有する。

(4) 至適 pH

- 10 35℃、60分間反応の条件下、pH約6.0乃至8.4の温度範囲内に至適 pH を有する。

(5) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持する条件下、約45℃以下に温度安定域を有する。

- 15 pH 6.0、60分間保持する条件において、1mM Ca^{2+} 存在下、約60℃以下に温度安定域を有する。

pH 8.0、60分間反応の条件下、55℃以下に温度安定域を有する。または、

- 20 pH 8.0、60分間保持する条件において、1mM Ca^{2+} 存在下、約60℃以下に温度安定域を有する。

(6) pH 安定性

4℃、24時間保持する条件下、pH約5.0乃至約10.0の範囲内に安定 pH 域を有する。

- 25 本発明のポリペプチドが作用する基質としては、澱粉、アミロペクチン、アミロース、グリコーゲンなどの α -1, 4グルコシル結合を含む多糖や、それらをアミラーゼ又は酸などによって部分的に加水分解して得られるア

ミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖などの部分分解物が用いられる。これら α -1, 4結合を含むグルコ糖質を、更にブランチングエンザイムなどの枝付け酵素（EC 2. 4. 1. 18）で処理した糖質を用いることも随意である。アミラーゼで分解した部分分解物としては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ（Handbook of Amylases and Related Enzymes）』、パーガモン・プレス社（東京）（1988年）に記載されている、 α -アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 1）、 β -アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 2）、マルトトリオース生成アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 116）、マルトテトラオース生成アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 60）、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ（EC 3. 2. 1. 98）などのアミラーゼで分解した部分分解物を用いることができる。更には、部分分解物を調製する際、プルラーゼ（3. 2. 1. 41）、イソアミラーゼ（EC 3. 2. 1. 68）などの澱粉枝切り酵素を作用させることも随意である。基質としての澱粉は、とうもろこし、小麦、米などの穀類に由来する地上澱粉であっても、また馬鈴薯、さつまいも、タピオカなどの地下澱粉であってもよく、好ましくは、澱粉を糊化及び／又は液化した溶液として用いられる。その澱粉の部分分解の程度は低い程、環状四糖の生成率が高くなることから、DE約20以下、望ましくは約12以下、更に望ましくは約5以下が好適である。基質濃度は特に限定されない。例えば、基質濃度0. 1%（w/w）（以下、本明細書では、特に断らない限り、「%（w/w）」を単に「%」と略称する）の低濃度溶液として用いた場合でも、本発明の酵素反応は進行するが、工業的には、1%以上が好適である。又、基質溶液中に、完全に溶解しない不溶性基質を含有するものであってもよい。望ましくは、濃度40%以下、更に望ましくは20%以下が好適である。反応温度は反

応が進行する温度、即ち、65℃付近までの温度、好ましくは30乃至55℃付近の温度で実施すればよい。反応pHは、通常、4.5乃至8の範囲に調整すればよい。好ましくはpH約5.5乃至7の範囲に調整する。反応時間は酵素反応の進行により適宜選択する。

- 5 本発明のポリペプチドをその基質に作用させて生成した α -イソマルトシルグルコ糖質に α -イソマルトシル転移酵素を作用させることにより、斯界に於いて有用な環状四糖を大量かつ容易に製造することができる。 α -イソマルトシル転移酵素を作用させる時期は、本発明のポリペプチドを作用させ、当該ポリペプチドを失活させた後に作用させてもよい。しかしながら、好適には、本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素とを併用して作用させるのがよい。具体的には、澱粉又はその部分分解物やグリコーゲンの水溶液に本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素とを併用することにより、澱粉又はその部分分解物からは環状四糖が固形物当たり約30%以上の収率で、また、グリコーゲンの場合は固形物当たり約80%以上もの収率で環状四糖を得ることができる。本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素との併用する場合の環状四糖の生成メカニズムは、両者の反応特性から以下のように推察される。

- (1) 本発明のポリペプチドは、非還元末端の結合様式として α -1,4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質、例えば、澱粉、グリコーゲン、又はこれらの部分分解物などの糖質の非還元末端の α -1,4グルコシル基に作用し、グルコース基を他の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に α -イソマルトシル基を有する糖質が生成する。

- (2) α -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する糖質に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端に位置するイソマルトシル基を有する糖質の非還元末端グルコース基の3位水酸

基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質を生成する。

(3) α -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を糖質から切り離し、これを環状化して環状四糖を生成する。

(4) (3) に於いて、イソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を切り離された後の糖質は、再度、(1) から (3) の反応を経由することによって、環状四糖を生成し、更にこれらの反応が繰返されて著量の環状四糖が生成し蓄積される。

以上、説明したように、本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素の併用により、上記したように、両者がそれぞれの基質に繰り返し作用し、環状四糖の収率が著しく向上するものと推察される。

又、この環状四糖の生成反応に於いて、他の転移酵素を更に併用して、環状四糖の収率を向上させることも有利に実施できる。即ち、例えば、濃度約 15% の澱粉部分分解物に、本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素とを併用して作用させることにより、基質固形物当たり約 55% の収率で環状四糖が得られるところ、同じ条件で本発明のポリペプチドと α -イソマルトシル転移酵素並びにシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼの三者を併用して作用させることにより、基質固形物当たりの環状四糖の収率を更に約 5 乃至約 10% 高めて約 60 乃至約 65% にまで高めることができる。

上記の反応によって得られた溶液は、環状四糖又はこれを含有する糖質を含む溶液としてこのまま用いることも可能である。しかしながら、一般的には、これら糖質は適宜手法により精製して用いられる。精製方法としては、公知の方法を適宜採用すればよく、例えば、活性炭での脱色、精製、

H型、OH型イオン交換樹脂での脱塩、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコール及びアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、アミラーゼ、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ（EC 3.2.1.3）などや α -グルコシダーゼ（EC 3.2.1.20）などの酵素を用いて残存する他の糖質を分解する方法、酵母による発酵処理、アルカリ処理などによる残存する還元性糖質の分解除去などの各種精製方法を1種又は2種以上組み合わせて精製することができる。とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーが好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去することにより、高純度の環状四糖又はこれを含む糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

このようにして得られた環状四糖又はこれを含む糖質は、更に濃縮し、シラップ状製品とするか、乾燥して非晶質の環状四糖又はこれを含む粉末状糖質製品にすることも随意である。

又、環状四糖結晶を製造するには、例えば、有機溶媒存在下又は非存在下、固形物純度約50%以上、固形物濃度約30%乃至約90%の環状四糖高含有液を助晶缶にとり、固形物当たり、0.1乃至20%の環状四糖種結晶共存下で、温度95℃以下、望ましくは、10乃至90℃の範囲で、攪拌条件下、高温から低温に徐冷し、環状四糖結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットから環状四糖結晶又はこれを含む糖質を製造する方法としては、例えば、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥

方法などの公知の方法、又は含蜜結晶を製造する方法としては、分蜜方法などを適宜採用すればよい。

斯くして得られる環状四糖は、上品で低甘味を有する非還元性の白色粉末又はシラップで、安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸含有物質と混合し、加工しても、褐変すること
5 も、異臭を発生することも、又、混合した他の素材の物性を損なうことも殆どない。又、環状四糖は包接能を有していることから、香氣成分、有効成分などの揮散、品質劣化を防止し、香氣成分、有効成分の安定化保持に極めて優れている。この際、必要ならば、シクロ（環状）デキストリン類、
10 分岐シクロデキストリン類、シクロデキストラン類、シクロフラクタン類などの他の環状糖質を併用することにより、包接能による各種成分の安定化を更に高めることも有利に実施できる。前記環状四糖以外にシクロデキストリン類などの環状糖質は、高純度のものに限る必要はなく、低純度の環状糖質、例えば、多量のマルトデキストリンとともに各種のシクロデキ
15 ストリンを含有した澱粉部分分解物であっても用いることができる。

更に、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖は、アミラーゼや α -グルコシダーゼによって実質的に分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、又、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低
20 カロリーの水溶性食物繊維として利用することができ、虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料として、更には、粉末状物の付着、固結防止剤としても利用することができる。更に、斯かる環状四糖自体は、無毒、無害の天然甘味料であり、安全で安定な甘味料である。環状四糖結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤、糖衣錠に利用
25 することも有利に実施できる。又、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の結晶防止性、難醗酵性などの有用な性質をも具備

している。

従って、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

又、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質は、そのまま甘味付のための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、果糖、乳糖、異性化糖、砂糖、麦芽糖、トレハロース (α , α -トレハロース、 α , β -トレハロース、 β , β -トレハロース)、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリテルリチン、ソーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用すること、又、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や α -グリコシルステビオシド、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。

更に、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質は、そのままで、又は必要に応じて、他の増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して用いることも随意である。

又、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する

各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麺つゆ、

5 ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料への甘味料、更には、呈味改良剤、品質改良剤などとして使用することも有利に実施できる。又、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、

10 水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ

15 漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、

20 ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒

25 類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席

コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、品質改良などに有利に実施できる。又、家畜、家禽、その他は蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料など嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種の固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、さらに品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロナー α 、インターフェロナー β 、インターフェロナー γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、ツモア・ネクロシス・ファクター β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキン 1 などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸又はそのエステル誘導体、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、ア

ロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類又はローヤルゼリーなどの各種生理活性物質、更には、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペーストなどの有効成分や活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などを容易に製造できることとなる。

- 5 以上述べたような各種組成物に、本発明のポリペプチドを用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適宜選ばれる。含有させる環状四糖の量は、通常0.1%以上、望
- 10 ましくは、1%以上とするのが好適である。

- 以下、バチルス グロビスポルスC11株(FERM BP-7144)、バチルス グロビスポルスN75株(FERM BP-7591)、及びア
- ルスロバクター・グルビホルミスA19株(FERM BP-7590)
- 15 が産生する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペ
- チドの理化学的性質の解明、及び、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵
- 素活性を有するポリペプチドをコードするDNAの解明、更に、そのDN
- Aを利用した組換え型 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有す
- るポリペプチドの調製方法を実験例に基づいて説明する。

- 20 実験例1 バチルス グロビスポルスC11株由来 α -イソマルトシルグ
- ルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの調製

実験例1-1 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製

- 澱粉部分分解物『バインデックス#4』4.0%(w/v)、酵母抽出物
- 『アサヒミースト』1.8%(w/v)、リン酸二カリウム0.1%(w/
- 25 v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06%(w/v)、硫酸マグネシ
- ウム・7水塩0.05%(w/v)、及び水からなる液体培地を、500m

1 容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、2
0分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C11株を接種し、
27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。
容量30Lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入
5 れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1% (v/v)
を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気
攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 α -イソ
マルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.55単位/mlで、 α -イソ
マルトシル転移酵素活性は約1.8単位/mlであった。この培養物を遠
10 心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18Lの酵
素活性を測定したところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は
約0.51単位/ml(総活性約9,180単位)で、 α -イソマルトシ
ル転移酵素活性は約1.7単位/ml(総活性約30,400単位)であ
り、両酵素活性とも主に培養上清中に検出され、両酵素とも培養液に分泌
15 される分泌型酵素であることが判明した。

尚、前記に種類の酵素活性は次のようにして測定した。即ち、 α -イソ
マルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度
2% (w/v)となるよう100mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解さ
せ基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃
20 で60分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた
後、その反応液中のマルトース含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)
法で定量することによって行った。 α -イソマルトシルグルコ糖質生
成酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 μ モルのマルトースを
生成する酵素量と定義した。尚、HPLCは、『Shodex KS-80
25 1』カラム(昭和電工(株)製)を用い、カラム温度60℃、溶離液として
水の流速0.5ml/min水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-

8012』（東ソー（株）製）を用いて行なった。

又、 α -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度2%（w/v）となるように100mM酢酸緩衝液（pH6.0）に溶解させて基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で30分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応停止液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することにより行なった。 α -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 μ モルのグルコースを生成する酵素量と定義した。

10 実験例1-2 部分精製酵素標品の調製

実験例1-1の方法で得た培養上清約18Lを80%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000rpm、30分間）して回収し10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416mlを得た。この粗酵素液は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約8,440単位、 α -イソマルトシル転移酵素活性を約28,000単位含んでいた。この粗酵素液を『セファビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲル（三菱化学（株）製）を用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分、 α -イソマルトシル転移酵素活性成分は、何れも、『セパビーズ（Sepabeads）FP-DA13』ゲルには吸着せずに、両酵素活性は非吸着画分に検出された。この非吸着画分を回収し、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（Sephacryl）HR S-200』ゲル（アマシャム・ファルマシア・バイオテク（株）製）を用いたアフィニティークロマトグラフィー（ゲル量500ml）に供した。酵素活性成分は、『セファクリル（Se

phacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫安1 Mから0 Mに濃度低下するリニアグラジエント、これに続いて、マルトテトラオース0 mMから100 mMに濃度上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシル転移酵素活性成分と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は分離して溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活性は硫安利ニアグラジエント濃度が約0.3 M付近の画分に検出され、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエント濃度が約30 mM付近の画分に検出された。そこで、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分と α -イソマルトシル転移酵素活性画分とを個別に回収し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品としてそれぞれ回収し、これら酵素標品を別々に精製した。

15 実験例1-3 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの精製

実験例1-2の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を1 M硫安を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブテルートヨパール(Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲル(東ソー(株)製)を用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350 ml)に供した。本酵素活性成分は、『ブテルートヨパール(Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲルに吸着し、硫安1 Mから0 Mに濃度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約0.3 M付近で吸着した酵素活性成分が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。再度、この回収画分を1 M硫安を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に対

- して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、
- 5 比活性、収率を表1に示す。

表 1

工 程	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養上清	9, 180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8, 440	0.60	91.9
イオン交換カラム溶出液	6, 620	1.08	72.1
アフィニティカラム溶出液	4, 130	8.83	45.0
疎水カラム溶出液	3, 310	11.0	36.1
アフィニティカラム溶出液	2, 000	13.4	21.8

- 精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高いポリペプチドであった。
- 10

実験例 1-4 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの

精製

実験例 1 - 2 の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲル (東ソー (株) 製) を用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素活性成分は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M に濃度減少するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で溶出した。この本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップに於ける α -イソマルトシル転移酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性、収率を表 2 に示す。

表 2

工 程	α -イソマルトシル転移酵素ポリペプチド活性量 (単位)	α -イソマルトシル転移酵素ポリペプチド比活性 (単位 / mg 蛋白)	収率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティカラム溶出液	13,700	21.9	45.1

疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティカラム 溶出液	5,510	29.6	18.1

精製した α -イソマルトシル転移酵素活性有する酵素標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動によりその純度を検定したところ、その蛋白バンドは単一で純度の高いポリペプチドであった。

5

実験例2 バチルス グロビスポルス N75 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの調製

実験例2-1 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製

澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0% (w/v)、酵母抽出物
 10 『アサヒミースト』1.8% (w/v)、リン酸ニカリウム0.1% (w/v)、
 リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 ml ずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス N75 株を接種し、
 15 27℃、230 rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。
 容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1% (v/v) を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 α -イソ
 20 マルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.34単位/mlで、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.1単位/mlであった。この培養物を遠心分離 (10,000 rpm、30分間) して回収した上清約18Lの酵素活性を測定したところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.33単位/ml (総活性約5,940単位) で、 α -イソマルトシ

ル転移酵素活性は約 1.1 単位 / ml (総活性約 19,800 単位)であり、両酵素活性とも主に培養上清中に検出され、両酵素とも培養液に分泌される分泌型酵素であることが判明した。

5 実験例 2-2 部分精製酵素標品の調製

実験例 2-1 の方法で得た培養上清約 18 L を 80 % 飽和硫安液で塩析して 4 °C、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収し 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3) に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約 45.0 ml を得た。

- 10 この粗酵素液は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約 4,710 単位、 α -イソマルトシル転移酵素活性を約 15,700 単位含んでいた。この粗酵素液を『セファビーズ (Sepabeads) FP-DA 13』ゲル (三菱化学 (株) 製) を用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、『セファビーズ (Sepabeads) FP-DA 13』ゲルには吸着し、 α -イソマルトシル転移酵素活性成分は、『セファビーズ (Sepabeads) FP-DA 13』ゲルには吸着せずに非吸着画分に検出された。続いて、NaCl 濃度 0 M から 1 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、NaCl のリニアグラジエントでその濃度が約 0.25 M 付近で溶出した。そこで、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分と α -イソマルトシル転移酵素活性画分とを個別に回収し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品としてそれぞれ回収し、これら酵素標品を別々に精製した。

25

実験例 2-3 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリ

ペプチドの精製

実験例 2-2 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、この透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク (株) 製) を用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl HR S-200)』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M に濃度低下するリニアグラジエント、これに続いて、マルトテトラオース 0 mM から 100 mM に濃度上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエント濃度が約 30 mM 付近の画分に検出された。そこで、本酵素活性画分を回収した。この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲル (東ソー (株) 製) を用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性、収率を表 3 に示す。

表 3

工 程	α -イソマルト シルグルコ糖質 生成酵素ポリペ プチド活性量 (単位)	α -イソマルトシル グルコ糖質生成酵素 ポリペプチド比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養上清	5,940	0.10	100
硫酸塩析後の透析液	4,710	0.19	79.3
イオン交換カラム溶 出液	3,200	2.12	53.9
アフィニティカラム 溶出液	2,210	7.55	37.2
疎水カラム溶出液	1,720	10.1	29.0
アフィニティカラム 溶出液	1,320	12.5	22.2

精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品5の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高いポリペプチドであった。

実験例 2-4 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの精製

- 10 実験例 2-2 の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク (株) 製) を用いたアフィニティークロマトグラフィー

(ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sep
hacryl HR S-200)』ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M に濃
度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M
付近の画分に本酵素活性が検出された。そこで、本酵素活性画分を回収し
5 た。この回収液を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に
透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルートヨパール
(Butyl-ToyopEARL) 650 M』ゲル (東ソー (株) 製)
を用いた疎水クロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本酵素
活性成分は、『ブチルートヨパール (Butyl-ToyopEARL)
10 650 M』ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M に濃度減少するリニアグラジ
エントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M 付近で溶出した。この本
酵素活性を示す画分を集め回収した。この回収液を 10 mM トリス-塩酸
緩衝液 (pH 8.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、
『スーパーQ-ートヨパール (Super Q-ToyopEARL) 65
15 0 C』ゲル (東ソー (株) 製) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフ
ィー (ゲル量 380 ml) に供した。本酵素は、『スーパーQ-ートヨパール
(Super Q-ToyopEARL) 650 C』ゲルに吸着せずに、非
吸着画分に溶出し、得られた溶出画分を回収し、精製酵素標品とした。こ
の精製の各ステップに於ける α -イソマルトシル転移酵素活性を有する酵
20 素標品の酵素活性量、比活性、収率を表 4 に示す。

表 4

工 程	α -イソマルト シル転移酵素ポ リペプチド活性 量 (単位)	α -イソマルトシ ル転移酵素ポリペ プチド比活性 (単位/mg 蛋 白)	収率 (%)
培養上清	19,000	0.33	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.64	82.6
イオン交換カラム溶 出液	12,400	3.56	65.3
アフィニティカラム 溶出液	8,320	11.7	43.8
疎水カラム溶出液	4,830	15.2	25.4
イオン交換カラム溶 出液	3,850	22.6	20.3

精製した α -イソマルトシル転移酵素活性有する酵素標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動によりその純度を検定したところ、その蛋白バンドは単一で純度の高いポリペプチドであった。

実験例3 アルスロバクター グロビホルミス A19 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの調製

実験例3-1 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製

10 澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0% (w/v)、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8% (w/v)、リン酸ニカリウム0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v)、及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 ml ずつ入れ、オートクレーブで121℃、2

- 0 分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター・グロビホルミス A 1 9 株を接種し、27℃、230 rpm で48時間回転振盪培養したものを種培養とした。容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1% (v/v) を接種し、温度27℃、pH 6.0乃至9.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養物中の酵素活性を測定したところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約1.1単位/mlで、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.7単位/mlであった。この培養物を遠心分離(10,000 rpm、30分間)して回収した上清約18Lの
- 10 酵素活性を測定したところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約1.06単位/ml (総活性約19,100単位)で、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.6単位/ml (総活性約28,800単位)であり、両酵素活性とも主に培養上清中に検出され、両酵素とも培養液に分泌される分泌型酵素であることが判明した。
- 15 尚、アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定は、基質のための緩衝液として100 mMグリシン-NaOH緩衝液(pH 8.4)を用いた以外、実験例1に記載の方法と同様に行った。
- 20 実験例3-2 部分精製酵素標品の調製
- 実験例3-1の方法で得た培養上清約18Lを60%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000 rpm、30分間)して回収し10 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約850 mlを得た。
- 25 この粗酵素液は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を約8,210単位、 α -イソマルトシル転移酵素活性を約15,700単位含んで

いた。この粗酵素液を『DEAE-トヨパール (Toyoparl) 650S』ゲル (東ソー (株) 製) を用いたイオン交換クロマトグラフィー (ゲル量 380 ml) に供した。両酵素活性は、『DEAE-トヨパール (Toyoparl) 650S』ゲルには吸着し、NaCl 濃度 0 M から 1 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性成分は、NaCl のリニアグラジエントでその濃度が約 0.2 M 付近で溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活性成分は、NaCl のリニアグラジエントでその濃度が約 0.3 M 付近で溶出した。そこで、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分と α -イソマルトシル転移酵素活性画分とを個別に回収し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品、 α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品としてそれぞれ回収し、これら酵素標品を別々に精製した。

15 実験例 3-3 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの精製

実験例 3-2 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する部分精製酵素標品を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、この透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク (株) 製) を用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl HR S-200)』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M に濃度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、硫酸のリニアグラジエント濃度が約 0.2 M 付近の画分に検出された。そこで、本酵素活性画分を回収し、精製酵

素標品とした。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

表 5

工 程	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド比活性 (単位/mg 蛋白)	収率 (%)
培養上清	19,100	0.11	100
硫酸塩析後の透析液	8,210	0.48	43.0
イオン交換カラム溶出液	6,890	4.18	36.1
アフィニティカラム溶出液	5,220	35.1	27.3

5

精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品を7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高いポリペプチドであった。

10

実験例3-4 α -イソマルトシル転移酵素活性を有するポリペプチドの部分精製

実験例3-2の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素活性を有する部分精製酵素標品を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲル(アマシャム・ファルマシア・バイオテク(株)製)を用いたアフィニティークロマトグラフィー

15

(ゲル量 500 ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (S e p h a c r y l H R S - 2 0 0)』ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M に濃度低下するリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0 M 付近の画分に本酵素活性が検出された。そこで、本酵素活性画分を回収し、部分

5 精製酵素標品とした。この精製の各ステップに於ける α -イソマルトシル転移酵素活性を有する酵素標品の酵素活性量、比活性、収率を表 6 に示す。

表 6

工 程	α -イソマルトシル転移酵素ポリペプチド活性量 (単位)	α -イソマルトシル転移酵素ポリペプチド比活性 (単位 / mg 蛋白)	収率 (%)
培養上清	28,800	0.18	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.97	54.5
イオン交換カラム溶出液	7,130	4.01	24.8
アフィニティカラム溶出液	1,800	11.9	6.3

部分精製した α -イソマルトシル転移酵素活性有する酵素標品を 7.5% (w/v) 濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動によりその純度を検定したところ、メインの蛋白バンド以外に、3 種のマイナーな蛋白バンドが認められた。

10

実験例 4-1 各種糖質への作用

15 各種糖質を用いて、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチドの基質になりうるかどうかの試験をした。マルトース、マルトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオ

ース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パ
ノース、イソパノース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネ
オトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、マルト
トリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マ
5 ルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシドを含む溶液を調製した。

これらの溶液に、実験例 1 - 3 の方法で得たバチルス グロビスポルス
C 1 1 株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド
標品、又は実験例 2 - 3 の方法で得たバチルス グロビスポルス N 7 5 株
由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品、実
10 験例 3 - 3 の方法で得たアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 株由来
の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品を基質固
形物 1 グラム当たりそれぞれ 2 単位ずつ加え、基質濃度を 2 % (w/v)
になるように調整し、これを 30 °C、pH 6.0 (アルスロバクター グ
ロビホルミス A 1 9 株由来の酵素の場合、pH 8.4) で 24 時間作用さ
15 せた。酵素反応前後の反応液中の糖質を調べるため、シリカゲル薄層クロ
マトグラフィー (以下、「TLC」と略す。)を行なった。展開溶媒として
n-ブタノール、ピリジン、水混液 (容量比 6 : 4 : 1)、薄層プレートと
して『キーゼルゲル 60』(アルミプレート、20 × 20 cm、メルク社製)
を用い 2 回展開した後、硫酸-メタノール法で糖質を発色し検出し、それ
20 ぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果を表 7 に示す。

表 7

基 質	酵素作用		
	C 1 1 株酵素	N 7 5 株酵素	A 1 9 株酵素
マルトース	+	+	+
マルトトリオース	++	++	++
マルトテトラオース	+++	+++	+++
マルトペンタオース	+++	+++	+++

マルトヘキサオー ス	+++	+++	+++
マルトヘプタオー ス	+++	+++	+++
イソマルトース	—	—	—
イソマルトトリオ ース	—	—	—
パノース	—	—	—
イソパノース	++	++	++
トレハロース	—	—	—
コージビオース	+	+	+
ニゲロース	+	+	+
ネオトレハロース	+	+	+
セロビオース	—	—	—
ゲンチビオース	—	—	—
マルチトール	—	—	—
マルトトリイトー ル	+	+	+
ラクトース	—	—	—
スクロース	—	—	—
エルロース	+	+	+
セラギノース	—	—	—
マルトシルグルコ シド	++	++	++
イソマルトシルグ ルコシド	—	—	—

注) 酵素反応前後で、

—は、変化無しを示し、

＋は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物が認められるを示し、

5 ++は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物が認められるを示し、

+++は、基質のスポットがほとんど消失し、他の生成物が認められるを示す。

10 表7の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵

素活性を有するポリペプチドは、試験した各種糖質の内、グルコース重合度が3以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質によく作用することが判明した。又、グルコース重合度が2の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイトール、エルロースにも僅かに作用することが判明した。

実験例4-2 マルトオリゴ糖からの生成物

最終固形物濃度1%のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース又はマルトペンタオース水溶液に、実験例1-3の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを、固形物グラム当たり2単位（マルトース及びマルトトリオース水溶液の場合）、0.2単位（マルトテトラオース水溶液の場合）、0.1単位（マルトペンタオース水溶液の場合）加えて、35℃、pH6.0で8時間作用させ、100℃で10分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の糖組成をHPLC法を用いて測定した。HPLCは、『YMC Pack ODS-AQ303』カラム（（株）ワイエムシー製）を用い、カラム温度40℃、溶離液としての水の流速0.5ml/minの条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー（株）製）を用いて行なった。その結果を表8に示す。

表8

反応で生成した糖質の種類	基質マルトース	基質マルトトリオース	基質マルトテトラオース	基質マルトペンタオース
グルコース	8.5	0.1	0.0	0.0
マルトース	78.0	17.9	0.3	0.0
マルトトリオース	0.8	45.3	22.7	1.9
マルトテトラオース	0.0	1.8	35.1	19.2

マルトペンタオース	0.0	0.0	3.5	34.4
マルトヘキサオース	0.0	0.0	0.0	4.6
イソマルトース	0.5	0.0	0.0	0.0
グルコシルマルトース	8.2	1.2	0.0	0.0
グルコシルマルトトリオース	2.4	31.5	6.8	0.0
X	0.0	2.1	30.0	11.4
Y	0.0	0.0	1.4	26.8
Z	0.0	0.0	0.0	1.7
その他	0.6	0.1	0.2	0.0

表中の

5 グルコシルマルトースは、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース、パノース）、

グルコシルマルトトリオースは、 α -イソマルトシルマルトース（別名、 $6^3-O-\alpha$ -グルコシルマルトトリオース）、

Xは、本実験例で構造を明らかにした α -イソマルトシルマルトトリオース（別名、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）、

10 Yは、本実験例で構造を明らかにした α -イソマルトシルマルトテトラオース（別名、 $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース）、

Zは、未同定の糖質である。

15 表8の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを作用させた結果、基質としてのマルトースからは、主にグルコースと α -イソマルトシルグルコース（別名、 $6^2-O-\alpha$ -グルコシルマルトース）とが生成し、基質としてのマルトトリオースからは、主にマルトースと α -イソマルトシルマルトース（別名、 6^3-O-

0- α -グルコシルマルトトリオース)とが生成し、その他、少量ながらグルコース、マルトテトラオース、 α -イソマルトシルグルコース(別名、6²-0- α -グルコシルマルトース)、及び生成物Xが生成することが判明した。基質としてのマルトテトラオースからは、主にマルトトリオースと生成物Xとが生成し、その他、少量ながらマルトース、マルトペンタオース、 α -イソマルトシルマルトース(別名、6³-0- α -グルコシルマルトトリオース)、及び生成物Yが生成することが判明した。基質としてのマルトペンタオースからは、主にマルトテトラオースと生成物Yとが生成し、その他、少量ながらマルトトリオース、マルトヘキサオース、生成物X、及び生成物Zが生成することが判明した。

次いで、基質としてのマルトテトラオースからの主生成物である生成物Xと、基質としてのマルトペンタオースからの主生成物である生成物Yの精製と単離を行った。分取用HPLCカラム『YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A』((株)ワイエムシイ製)を用いて生成物X、Yを精製し単離することにより、上記マルトテトラオースからの反応物から、純度99.9%以上の生成物X標品を固形物収率約8.3%で、また上記マルトペンタオースからの反応物から、純度99.9%以上の生成物Yを固形物収率約11.5%で単離した。

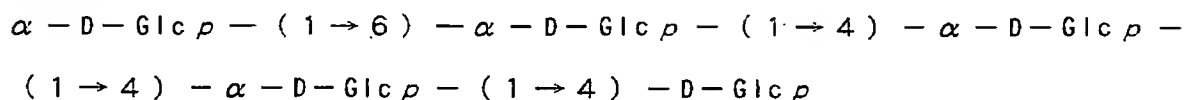
これら生成物X及び生成物Yについて、常法に従ってメチル化分析とNMR分析とを行なった。メチル化分析結果は表9にまとめた。NMR分析の結果については、生成物Xと生成物Yの¹H-NMRスペクトルを第1図および第2図にそれぞれ示した。又、生成物Xと生成物Yの¹³C-NMRスペクトルを第3図及び第4図にそれぞれ示し、それらの帰属を表10にまとめた。

表 9

分析メチル化物の種類	組 成 比	
	生成物 X	生成物 Y
2, 3, 4-トリメチル化物	1. 0 0	1. 0 0
2, 3, 6-トリメチル化物	3. 0 5	3. 9 8
2, 3, 4, 6-テトラメチル化物	0. 8 2	0. 8 5

これらの結果から、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドによるマルトテトラオースからの生成物 X は、マルトテトラオースの非還元末端グルコースの 6 位水酸基にグルコース基が α -結合した 5 糖で、構造式 1 で表わされる α -イソマルトシルマルトトリオース（別名、6⁴-O- α -グルコシルマルトテトラオース）であることが判明した。

10 構造式 1



又、マルトペンタオースからの生成物 Y は、マルトペンタオースの非還元末端グルコースの 6 位水酸基にグルコシル基が α 結合した 6 糖で、構造式 2 で表わされる α -イソマルトシルマルトテトラオース（別名、6⁵-O- α -グルコシルマルトペンタオース）であることが判明した。

構造式 2

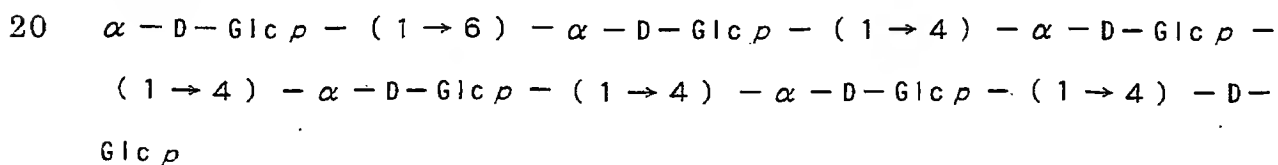


表 1 0

グルコース 番号	炭素番 号	NMR化学シフト値 (p . p m)	
		生成物 X	生成物 Y
a	1 a	1 0 0 . 8	1 0 0 . 8
	2 a	7 4 . 2	7 4 . 2
	3 a	7 5 . 8	7 5 . 7
	4 a	7 2 . 2	7 2 . 2
	5 a	7 4 . 5	7 4 . 5
	6 a	6 3 . 2	6 3 . 1
b	1 b	1 0 2 . 6	1 0 2 . 6
	2 b	7 4 . 2	7 4 . 2
	3 b	7 5 . 8	7 5 . 7
	4 b	7 2 . 1	7 2 . 1
	5 b	7 4 . 0	7 4 . 0
	6 b	6 8 . 6	6 8 . 6
c	1 c	1 0 2 . 3	1 0 2 . 3
	2 c	7 4 . 2	7 4 . 2
	3 c	7 6 . 0	7 6 . 0
	4 c	7 9 . 6	7 9 . 5
	5 c	7 3 . 9	7 3 . 9
	6 c	6 3 . 2	6 3 . 1
d	1 d	1 0 2 . 2	1 0 2 . 3
	2 d	7 4 . 0 (α), 7 4 . 4 (β)	7 4 . 2
	3 d	7 6 . 0	7 6 . 0
	4 d	7 9 . 8	7 9 . 5
	5 d	7 3 . 9	7 3 . 9
	6 d	6 3 . 2	6 3 . 1

e	1 e	94.6 (α), 98.5 (β)	102.1
	2 e	74.2 (α), 76.7 (β)	74.0 (α), 74.4 (β)
	3 e	75.9 (α), 78.9 (β)	76.0
	4 e	79.6 (α), 79.4 (β)	79.8
	5 e	72.6 (α), 77.2 (β)	73.9
	6 e	63.4 (α), 63.4 (β)	63.1
f	1 f		94.6 (α), 98.5 (β)
	2 f		74.2 (α), 76.7 (β)
	3 f		76.0 (α), 78.9 (β)
	4 f		79.6 (α), 79.5 (β)
	5 f		72.6 (α), 77.2 (β)
	6 f		63.3 (α), 63.3 (β)

以上のことから、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドのマルトオリゴ糖に対する作用を以下のように判断された。

- 1) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド
5 は、基質として、非還元末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質に作用し、その非還元末端のグルコシル残基を他の分子の非還元末端のグルコシル残基の6位に転移する作用を有する分子間の6-グルコシル転移を触媒して、非還元末端に6-O- α -グルコシル基を有するグルコース重合度が1増加した α -イソマルトシルグルコ糖質（別名、6-O- α -グルコシルマルトオリゴ糖）と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを生成する。
- 2) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド
15 は、4-グルコシル転移も僅かに触媒し、マルトオリゴ糖から、グルコース重合度が1増加したマルトオリゴ糖と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを僅かに生成する。

実験例 4 - 3 還元力生成試験

α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドが、還元力生成能を有するか否かを調べることを目的として以下の試験を行った。即ち、最終濃度 1 % のマルトテトラオース水溶液に、実験例 1 - 3 の方法で得たバチルス グロビスポルス C 1 1 株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品、又は実験例 2 - 3 の方法で得たバチルス グロビスポルス N 7 5 株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品、実験例 3 - 3 の方法で得たアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素ポリペプチド標品を、基質固形物 1 グラム当たり 0. 25 単位加え、35℃、pH 6. 0 (アルスロバクター グロビホルミス A 1 9 株由来の酵素の場合、pH 8. 4) で作用させ、その反応液の一部を経時的に採り、100℃で10分間保持して反応を停止し、反応液の還元力を測定した。即ち、その酵素反応前後の溶液の還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定し、また、同時にその酵素反応前後の溶液の全糖量をアントロン硫酸法で測定し、還元力生成率 (%) は以下の計算式を用いて算出した。

計算式：

$$\text{還元力生成率 (\%)} = \left[\frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} - \frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right] \times 100$$

結果を表 1 1 に示す。

表 1 1

反応時間 (時間)	還元力生成率 (%)		
	C 1 1 株酵素	N 7 5 株酵素	A 1 9 株酵素
0	0 . 0	0 . 0	0 . 0
1	0 . 1	0 . 1	0 . 0
2	0 . 0	0 . 0	0 . 1
4	0 . 1	0 . 0	0 . 0
8	0 . 0	0 . 1	0 . 1

表 1 1 の結果から明らかなように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドは、マルトテトラオースを基質として作用させると、反応物の還元力は増加しないことがわかり、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドは加水分解作用を示さない若しくは検出できないほど僅かなものであることが判明した。

実験例 4-4 分子量

10 実験例 1-3 の方法で精製して得たバチルス グロビスポルス C 1 1 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、実験例 2-3 の方法で精製して得たバチルス グロビスポルス N 7 5 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、または、実験例 3-3 の方法で精製して得たアルスロバクター グロビホルミス A 1 9 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを、S D S-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7 . 5 % (w / v) に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ（株）製）と比較して当該酵素ポリペプチドの分子量を測定した。C 1 1 株由来の当該ポリペプチドの分子量は約 1 3 7 , 0 0 0 \pm 2 0 , 0 0 0 ダルトンで、N 7 5 株由来の当該ポリペプチドの分子量

は約 136,000 \pm 20,000 ダルトンで、A19 株由来の当該ポリペプチドの分子量は約 94,000 \pm 20,000 ダルトンであった。

実験例 4-5 等電点

- 5 実験例 1-3 の方法で精製して得た C11 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、実験例 2-3 の方法で精製して得た N75 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、または、実験例 3-3 の方法で精製して得た A19 株由来 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを、
- 10 2% (w/v) アンフォライン (アマシャム・ファルマシア・バイオテク (株) 製) 含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、電気泳動後の蛋白バンド及びゲルの pH を測定して当該酵素ポリペプチドの等電点を求めた。その結果、C11 株由来の当該ポリペプチドの等電点は pI 約 5.2 \pm 0.5 で、N75 株由来の当該ポリペプチドの等電点は pI 約 7.3 \pm 0.5 で、A19 株由来の当該ポリペプチドの等電点は pI 約 4.3 \pm 0.5 で、あった。
- 15

実験例 4-6 作用温度及び pH

- α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性に及ぼす温度と pH の影響
- 20 について、各種温度、pH 条件下、実験例 1-1 に示す α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性測定法に準じて調べた。温度の影響については、Ca²⁺ 非存在下と 1 mM 存在下で測定した。これらの結果を第 5 図 [温度の影響 (C11 株由来ポリペプチド)]、第 6 図 [温度の影響 (N75 株由来のポリペプチド)]、第 7 図 [温度の影響 (A19 株由来のポリペプチド)]、第 8 図 [pH の影響 (C11 株由来ポリペプチド)]、第 9 図 [pH の影響 (N75 株由来のポリペプチド)]、第 10 図 [pH の影響 (A19
- 25

株由来のポリペプチド)] に示した。その結果、C 1 1 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有する酵素標品の至適温度は、p H 6. 0、6 0 分間反応で、約 4 5 °C (C a ²⁺ 非存在) 又は約 5 0 °C (1 m M C a ²⁺ 存在) で、その至適 p H は、3 5 °C、6 0 分間反応で約 6. 0 で、N 7 5 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの至適温度は、p H 6. 0、6 0 分間反応で、約 5 0 °C (C a ²⁺ 非存在) 又は約 5 5 °C (1 m M C a ²⁺ 存在) で、その至適 p H は、3 5 °C、6 0 分間反応で約 6. 0 で、A 1 9 株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの至適温度は、p H 8. 4、6 0 分間反応で、約 6 0 °C (C a ²⁺ 非存在) 又は約 6 5 °C (1 m M C a ²⁺ 存在) で、その至適 p H は、3 5 °C、6 0 分間反応で約 8. 4 であった。

実験例 4-7 安定性

α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの温度安定性は、当該ポリペプチド含有溶液 [2 0 m M 酢酸緩衝液、p H 6. 0 (A 1 9 株由来のポリペプチドの場合、2 0 m M グリシン-N a O H 緩衝液、p H 8. 0)] を C a ²⁺ 非存在下または 1 m M C a ²⁺ 存在下で各温度に 6 0 分間保持し、水冷した後、残存する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を測定することにより求めた。又、p H 安定性は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドを各 p H の 5 0 m M 緩衝液中で 4 °C、2 4 時間保持した後、p H を 6. 0 (A 1 9 株由来のポリペプチドの場合、p H 8. 0) に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。これらの結果を第 1 1 図 [温度安定性 (C 1 1 株由来のポリペプチド)]、第 1 2 図 [温度安定性 (N 7 5 株由来のポリペプチド)]、第 1 3 図 [温度安定性 (A 1 9 株由来のポリペプチド)]、第 1 4 図 [p H 安定性 (C 1 1 株由来ポリペプチド)]、第 1 5 図 [p H 安定性

(N75株由来のポリペプチド)]、第16図[pH安定性(A19株由来のポリペプチド)]に示した。C11株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの温度安定性は約40℃まで(Ca^{2+} 非存在)又は約45℃まで(1 mM Ca^{2+} 存在)で、当該ポリペプチドの
5 pH安定性は約5.0乃至10.0で、N75株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの温度安定性は約45℃まで(Ca^{2+} 非存在)又は約50℃まで(1 mM Ca^{2+} 存在)で、当該ポリペプチドのpH安定性は約5.0乃至9.0で、A19株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの温度安定性
10 は約55℃まで(Ca^{2+} 非存在)又は約60℃まで(1 mM Ca^{2+} 存在)で、当該ポリペプチドのpH安定性は約5.0乃至9.0であった。

実験例5 部分アミノ酸配列

実験例5-1 N末端アミノ酸配列

15 実験例1-3の方法で精製して得たC11株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、実験例2-3の方法で精製して得たN75株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチド、または、実験例3-3の方法で精製して得たA19株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドについて、そのN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル473A』(アプライドバイオシステムズ社製)を用いて分析したところ、
20 C11株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドは配列表に於ける配列番号7に示すアミノ酸配列を有し、N75株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドは配列表に於ける配列番号19に示すアミノ酸配列を有し、A19株由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドは

25

配列表に於ける配列番号 26 に示すアミノ酸配列を有することが判明した。

実験例 5-2 C11 株由来のポリペプチドの内部アミノ酸配列

実験例 1-3 の方法で精製して得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成
5 酵素活性を有するポリペプチドの一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、得られた透析液を同緩衝液で約 1 mg / ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 10 μ g のトリプシン (和光純薬 (株) 販売) を加え、30 $^{\circ}$ C、22 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC
10 LC を行なった。即ち、『マイクロボンドバック C18 カラム』(直径 2.1 mm \times 長さ 150 mm、ウオーターズ (株) 製) を用い、室温下、流速 0.9 ml / 分の条件で、0.1% トリフルオロ酢酸-8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸-40% アセトニトリル溶液の 120 分間かけて移行するリニアグラジエント条件下、ペプチドをカラム分画した。
15 カラムから溶出してくるペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 10 ペプチド [P8 (保持時間約 8 分)、P20 (保持時間約 20 分)、P56 (保持時間約 56 分)、P60 (保持時間約 60 分)、P62 (保持時間約 62 分)、P64 (保持時間約 64 分)、P75 (保持時間約 75 分)、P82 (保持時間約 82 分)、
20 P88 (保持時間約 88 分)、P99 (保持時間約 99 分)] を分取し、それぞれのペプチド含有画分を真空乾燥した後、200 μ l の 0.1% トリフルオロ酢酸-50% アセトニトリル溶液に溶解した後、個々のペプチドをプロテインシーケンサーに供し、それぞれアミノ酸配列を分析したところ、配列表に於ける配列番号 8 乃至 17 に示すアミノ酸配列が得られた。

実験例 5-3 N75 株由来ポリペプチドの内部アミノ酸配列

実験例 2-3 の方法で精製して得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、得られた透析液を同緩衝液で約 1 mg / ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 20 μ g の

5 リシルエンドペプチダーゼ (和光純薬 (株) 販売) を加え、30℃、24 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相 HPLC を行なった。即ち、『マイクロボンドスフェア C18 カラム』(直径 3.9 mm \times 長さ 150 mm、ウオーターズ (株) 製) を用い、室温下、流速 0.9 ml / 分の条件で、0.1% トリフルオロ酢酸-8% アセトニトリル溶液から 0.1% トリフルオロ酢酸-36% アセトニ

10 トリル溶液の 12.0 分間かけて移行するリニアグラジエント条件下、ペプチドをカラム分画した。カラムから溶出してくるペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 5 ペプチド [PN 47 (保持時間約 47 分)、PN 59 (保持時間約 59 分)、PN 67 (保持時間約 67 分)、PN 87 (保持時間約 87 分)、PN

15 89 (保持時間約 89 分)] を分取し、それぞれのペプチド含有画分を真空乾燥した後、200 μ l の 0.1% トリフルオロ酢酸-50% アセトニトリル溶液に溶解した後、個々のペプチドをプロテインシーケンサーに供し、それぞれアミノ酸配列を分析したところ、配列表に於ける配列番号 20 乃至 24 に示すアミノ酸配列が得られた。

20

実験例 5-4 A19 株由来のポリペプチドの内部アミノ酸配列

実験例 3-3 の方法で精製して得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの一部を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、得られた透析液を同緩衝液で約 1 mg / ml の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 20 μ g の

25

リジルエンドペプチダーゼ（和光純薬（株）販売）を加え、30℃、24時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行なった。即ち、『マイクロボンドスフェアC18カラム』（直径2.1mm×長さ150mm、ウオーターズ（株）製）を用い、室温下、流速0.9ml/分の条件で、0.1%トリフルオロ酢酸－16%アセトニトリル溶液から0.1%トリフルオロ酢酸－36%アセトニトリル溶液の120分間かけて移行するリニアグラジエント条件下、ペプチドをカラム分画した。カラムから溶出してくるペプチドは、波長210nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した5ペプチド〔PA39（保持時間約39分）、PA81（保持時間約81分）、PA86（保持時間約86分）、PA92（保持時間約92分）、PN104（保持時間約104分）〕を分取し、それぞれのペプチド含有画分を真空乾燥した後、200μlの0.1%トリフルオロ酢酸－50%アセトニトリル溶液に溶解した後、個々のペプチドをプロテインシーケンサーに供し、それぞれアミノ酸配列を分析したところ、配列表に於ける配列番号27乃至31に示すアミノ酸配列が得られた。

実験例6 バチルス グロビスポルスC11株由来のポリペプチドをコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製

20

実験例6-1 染色体DNAの調製

澱粉部分分解物『バインデックス#4』2.0%（w/v）、酵母抽出物『アサヒミースト』1.0%（w/v）、リン酸二カリウム0.1%（w/v）、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06%（w/v）、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%（w/v）及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、2

0 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C 1 1 株を接種し、
2 7 °C、2 3 0 r p m で 2 4 時間回転振盪培養した。その後、遠心分離に
より培養物から採取した菌体を T E S 緩衝液 (p H 8 . 0) に浮遊させ、
リゾチームを 0 . 0 5 % (w / v) 加え、3 7 °C で 3 0 分間インキュベ
5 トした。処理物を - 8 0 °C で 1 時間凍結後、T S S 緩衝液 (p H 9 . 0)
を加えて 6 0 °C に加温し、T E S 緩衝液 / フェノール混液を加え、氷水中
で冷却しながら 5 分間激しく振盪した後、遠心分離により上清を採取した。
この上清に 2 倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体 D N A を採取
し、S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテ
1 0 ナーゼをそれぞれ 7 . 5 μ g 又は 1 2 5 μ g 加え、3 7 °C で 1 時間イン
キュベートして反応させた。反応物にクロロホルム / イソアミルアルコール
混液を加えて染色体 D N A を抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色
体 D N A を含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体 D N A を
濃度約 1 m g / m l になるように S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) に溶解し、
1 5 溶液を - 8 0 °C で凍結した。

実験例 6 - 2 形質転換体 B G C 2 の調製

実験例 6 - 1 で調製した精製染色体 D N A 溶液を 1 m l とり、これに制
限酵素 S a u 3 A I を約 3 5 単位加え、3 7 °C で 2 0 分間反応させて染
2 0 色体 D N A を部分分解した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約 2 , 0 0 0
乃至 6 , 0 0 0 塩基対からなる D N A 断片を採取した。別途、プラスミド
ベクター『B l u e s c r i p t I I S K (+)』(ストラタジーン・ク
ローニング・システム (株) 製) を常法により制限酵素 B a m H I を作
用させて完全に切断した後、その切断されたプラスミドベクター 0 . 5 μ
2 5 g と先に得た D N A 断片約 5 μ g とを『D N A ライゲーション・キット』
(宝酒造 (株) 製) を用いて、添付の説明書にしたがって操作し連結し、

得られた組換えDNAを用いて、通常のコンピテントセル法によりコンピテントセル『Epicurian Coli XL2-Blue』（ストラタジーン・クローニング・システム（株）製）を100 μ lを形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。得られた遺伝子ライブラリーとしての

5 形質転換体を、常法により調製した、トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、アンピシリンナトリウム塩100mg/L、及び5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトシド50mg/Lを含む寒天平板培地（pH7.0）に植菌し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約5,000個をアマ

10 シャム製ナイロン膜『Hybond-N+』上に固定した。別途、実験例5-2の方法で明らかにした、配列表に於ける配列番号16に示すアミノ酸配列における第4番目より第11番目までのアミノ酸配列に基づき5'-GGNTTYATGAAYTTYAGR TGGGA-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にしたがい[γ - 32 P]

15 ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識してプローブ1としての合成DNAを得た。先に得たナイロン膜上に固定したコロニーのうち、プローブ1と顕著な会合を示すコロニーにつき、通常のコロニーハイブリダイゼーション法を適応して2種類の形質転換体を選択した。常法により、これら2種類の形質転換体から組換えDNAを採取する一方、

20 配列表に於ける配列番号17に示すアミノ酸配列における第4番目より第11番目までのアミノ酸配列に基づき5'-GAYGCNTGGATGT TYGGNGAY TGG-3'で表わされる塩基配列のプローブ2を化学合成し、同様に同位体標識後、通常のスザン・ハイブリダイズを適応して、顕著な会合を示した組換えDNAを選択し、当該形質転換体を『BG

25 C2』と命名した。

実験例 6-3 DNA 配列の解明

実施例 6-2 の方法で得た形質転換体『BGC2』を常法に従い、アンピシリンナトリウムを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む L-プロス培地 (pH 7.0) に植菌し、 37°C で 24 時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリー SDS 法により組換え DNA を抽出した。この組換え DNA の塩基配列を、通常のリボキシ法により分析したところ、当該組換え DNA は、バチルス グロビスポルス C 11 株に由来する、鎖長 5294 塩基対の、配列表に於ける配列番号 18 に示す塩基配列の DNA を含んでいた。第 17 図に示すように、この組換え DNA において、当該 DNA は、制限酵素 Xba I による認識部位の下流に連結されていた。一方、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、その配列番号 18 に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と、実験例 5-1 の方法で確認された本発明のポリペプチドの N 末端アミノ酸配列及び実験例 5-2 の方法で明らかにされた中間部部分アミノ酸配列である、配列表に於ける配列番号 7 及び配列番号 8 乃至 17 に示すアミノ酸配列と比較したところ、配列表に於ける配列番号 7 に示すアミノ酸配列は、配列番号 18 に併記したアミノ酸配列に於ける第 36 乃至 44 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。また、配列表における配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15、16 及び 17 に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列表に於ける配列番号 18 に併記したアミノ酸配列に於ける第 823 乃至 832 番目、第 576 乃至 589 番目、第 874 乃至 904 番目、第 1117 乃至 1141 番目、第 657 乃至 670 番目、第 367 乃至 399 番目、第 970 乃至 993 番目、第 938 乃至 953 番目、第 279 乃至 295 番目及び第 632 乃至 651 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。尚、配列表に於ける配列番号 18 に於ける第 4783 乃至 4785 番目の塩基配列は、翻訳終止コドン ($5'-TAA-3'$) をコードし

ていることから、本発明のポリペプチドのC末端は、その直前のグルタミン酸（配列表に於ける配列番号18に於ける第1284番目のアミノ酸）であることが判明した。

これらの結果は、本発明のポリペプチドが配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有し、本発明のポリペプチドは、バチルス グロビス
5 ポルスC11株に於いては、配列表における配列番号4に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。又、配列表における配列番号18に併記したアミノ酸配列における第1乃至35番目のアミノ酸配列は、当該ポリペプチドの分泌シグナル配列と推定された。これらのこ
10 とから、当該ポリペプチドの分泌前の前駆体ペプチドは、配列表に於ける配列番号18に併記されたアミノ酸配列からなり、そのアミノ酸配列は、配列表における配列番号18に示す塩基配列にコードされていることが判明した。このようにして、その塩基配列を確認した組換えDNAを『pBGC2』と命名した。

15

実験例7 バチルス グロビスポルスN75株由来のポリペプチドをコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製

実験例7-1 染色体DNAの調製

澱粉部分分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、酵母抽出物
20 『アサヒミースト』1.0% (w/v)、リン酸ニカリウム0.1% (w/v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシウム・7水塩0.05% (w/v) 及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス N75株を接種し、
25 27℃、230rpmで24時間回転振盪培養した。その後、遠心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液 (pH8.0) に浮遊させ、

リゾチームを0.05% (w/v) 加え、37℃で30分間インキュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液 (pH 9.0) を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、氷水中で冷却しながら5分間激しく振盪した後、遠心分離により上清を採取した。

- 5 この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体DNAを採取し、SSC緩衝液 (pH 7.1) に溶解後、リボヌクレアーゼとプロテイナーゼをそれぞれ7.5 μ g 又は125 μ g 加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム/イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1 mg/mlになるようにSSC緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。
- 10

実験例 7-2 形質転換体 BGN 2 の調製

- 15 実験例 7-1 で調製した精製染色体DNA溶液を1 ml とり、これに制限酵素Kpn Iを約200単位加え、37℃で16時間反応させて染色体DNAを分解した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約3,000乃至7,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、プラスミドベクター『Bluescript II SK (+)』(ストラタジーン・クローニング・システム社製)を常法により制限酵素Kpn Iを作用させて完全に切断した後、その切断されたプラスミドベクター0.5 μ gと先に得たDNA断片約5 μ gとを『DNAライゲーション・キット』(宝酒造(株)製)を用いて、添付の説明書にしたがって操作し連結し、得られた組換えDNAを用いて、通常のコンピテントセル法によりコンピテントセル『Epilurian Coli XL2-Blue』(ストラタジーン・クローニング・システム社製)を100 μ lを形質転換して遺伝子ライブラリーを
- 20
- 25

作製した。得られた遺伝子ライブラリーとしての形質転換体を、常法により調製した、トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g/L、塩化ナトリウム 5 g/L、アンピシリンナトリウム塩 100 mg/L 及び 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトシド 50 mg/L を含む寒天
5 平板培地 (pH 7.0) に植菌し、37°C で 24 時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約 2,500 個をナイロン膜『Hybond-N+』(アマシャム製) 上に固定した。別途、実験例 5-3 の方法で明らかにした、配列表に於ける配列番号 24 に示すアミノ酸配列における第 4 番目より第 11 番目までのアミノ酸配列に基づき 5'-GAYGCNTGGA
10 TGT TYGGNGAYTGG-3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にしたがい [γ - 32 P] ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同位体標識してプローブ 1 としての合成 DNA を得た。先に得たナイロン膜上に固定したコロニーのうち、プローブ 1 と顕著な会合を示すコロニーにつき、通常のコロニーハイブリダイゼーション法を適応して 3 種類の形質転換体を選択した。常法により、これら
15 3 種類の形質転換体から組換え DNA を採取する一方、配列表に於ける配列番号 23 に示すアミノ酸配列における第 14 番目より第 21 番目までのアミノ酸配列に基づき 5'-GTNAAYCARAAYCAYTG GTTYTA-3' で表わされる塩基配列のプローブ 2 を化学合成し、同様に同位体標識後、通常
20 のサザン・ハイブリダイズを適応して、顕著な会合を示した組換え DNA を選択し、当該形質転換体を『BGN2』と命名した。

実験例 7-3 DNA 配列の解明

実施例 7-2 の方法で得た形質転換体『BGN2』を常法に従い、アンピシリンナトリウムを 100 μ g/ml 含む LB 培地 (pH 7.0) に植菌し、37°C で 24 時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分

25

離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを抽出した。この組換えDNAの塩基配列を、通常のアデオキシ法により分析したところ、当該組換えDNAは、バチルス グロビスポルス N75 株に由来する、鎖長 4991 塩基対の、配列表に於ける配列番号 25 に示す塩基配列の DNA を含んでいた。第 18 図に示すように、この組換え DNA において、当該 DNA は、制限酵素 Kpn I による認識部位の下流に連結されていた。一方、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、その配列番号 25 に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と、実験例 5-1 の方法で確認された本発明のポリペプチドの N 末端アミノ酸配列及び実験例 5-3 の方法で明らかにされた中間部部分アミノ酸配列である、配列表に於ける配列番号 19 及び配列番号 20 乃至 24 に示すアミノ酸配列と比較したところ、配列表に於ける配列番号 19 に示すアミノ酸配列は、配列番号 25 に併記したアミノ酸配列に於ける第 36 乃至 43 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。また、配列表における配列番号 20、21、22、23、及び 24 に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列表に於ける配列番号 25 に併記したアミノ酸配列に於ける第 907 乃至 925 番目、第 367 乃至 386 番目、第 1034 乃至 1058 番目、第 996 乃至 1020 番目、及び第 632 乃至 642 番目のアミノ酸配列と完全に一致した。尚、配列表に於ける配列番号 25 に於ける第 4294 乃至 4296 番目の塩基配列は、翻訳終止コドン (5'-TAA-3') をコードしていることから、本発明のポリペプチドの C 末端は、その直前のグルタミン (配列表に於ける配列番号 25 に於ける第 1286 番目のアミノ酸) であることが判明した。

これらの結果は、本発明のポリペプチドが配列表における配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有し、本発明のポリペプチドは、バチルス グロビスポルス N75 株に於いては、配列表における配列番号 5 に示す塩基配列の

DNAによりコードされていることを示している。又、配列表における配
列番号25に併記したアミノ酸配列における第1乃至35番目のアミノ酸
配列は、当該ポリペプチドの分泌シグナル配列と推定された。これらのこ
とから、当該ポリペプチドの分泌前の前駆体ペプチドは、配列表に於ける
5 配列番号25に併記されたアミノ酸配列からなり、そのアミノ酸配列は、
配列表における配列番号25に示す塩基配列にコードされていることが判
明した。このようにして、その塩基配列を確認した組換えDNAを『pB
GN2』と命名した。

10 実験例8 アルスロバクター グロビホルミスA19株由来のポリペプ
チドをコードするDNAを含む組換えDNAと形質転換体の調製

実験例8-1 染色体DNAの調製

澱粉部分分解物『パインデックス#4』2.0% (w/v)、酵母抽出物
『アサヒミースト』1.0% (w/v)、リン酸ニカリウム0.1% (w/
15 v)、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06% (w/v)、硫酸マグネシ
ウム・7水塩0.05% (w/v) 及び水からなる液体培地を、500m
l容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、2
0分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター グロビホルミスA19株を
接種し、27℃、230rpmで24時間回転振盪培養した。その後、遠
20 心分離により培養物から採取した菌体をTES緩衝液 (pH8.0) に浮
遊させ、リゾチームを0.05% (w/v) 加え、37℃で30分間イン
キュベートした。処理物を-80℃で1時間凍結後、TSS緩衝液 (pH
9.0) を加えて60℃に加温し、TES緩衝液/フェノール混液を加え、
氷水中で冷却しながら5分間激しく振盪した後、遠心分離により上清を採
25 取した。この上清に2倍容の冷エタノールを加え、沈殿した粗染色体DNA
を採取し、SSC緩衝液 (pH7.1) に溶解後、リボヌクレアーゼと

プロテイナーゼをそれぞれ7.5 μ g又は125 μ g加え、37℃で1時間インキュベートして反応させた。反応物にクロロホルム／イソアミルアルコール混液を加えて染色体DNAを抽出し、冷エタノールを加え、生成した染色体DNAを含む沈殿を採取した。このようにして得た精製染色体DNAを濃度約1 mg/mlになるようにSSC緩衝液(pH 7.1)に溶解し、溶液を-80℃で凍結した。

実験例 8-2 形質転換体 AGA1 の調製

実験例 8-1 で調製した精製染色体DNA溶液を1 mlとり、これに制限酵素Kpn Iを約10単位加え、37℃で30分間反応させて染色体DNAを部分分解した後、蔗糖密度勾配超遠心法により約4,000乃至8,000塩基対からなるDNA断片を採取した。別途、プラスミドベクター『Bluescript II SK (+)』(ストラタジーン・クローニング・システム(株)製)を常法により制限酵素Kpn Iを作用させて完全に切断した後、その切断されたプラスミドベクター0.5 μ gと先に得たDNA断片約5 μ gとを『DNAライゲーション・キット』(宝酒造(株)製)を用いて、添付の説明書にしたがって操作し連結し、得られた組換えDNAを用いて、通常のコンプテントセル法によりコンピテントセル『Epilcurian Coli XL2-Blue』(ストラタジーン・クローニング・システム(株)製)を100 μ lを形質転換して遺伝子ライブラリーを作製した。得られた遺伝子ライブラリーとしての形質転換体を、常法により調製した、トリプトン10 g/L、酵母エキス5 g/L、塩化ナトリウム5 g/L、アンピシリンナトリウム塩100 mg/L、及び5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトシド50 mg/Lを含む寒天平板培地(pH 7.0)に植菌し、37℃で24時間培養後、培地上に形成された白色のコロニー約6,000個をナイロン膜『H

y b o n d - N + 』(アマシャム(株)製)上に固定した。別途、実験例 5
- 4 の方法で明らかにした、配列表に於ける配列番号 27 に示すアミノ酸
配列における第 1 番目より第 11 番目までのアミノ酸配列に基づき 5' -
C A R G A R T G G A A Y Y T N A C N G G N G A Y C C N T G G A C -
5 3' で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、常法にし
たがい [γ - 32 P] A T P 及び T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて同
位体標識してプローブ 1 としての合成 DNA を得た。先に得たナイロン膜
上に固定したコロニーのうち、プローブ 1 と顕著な会合を示すコロニーに
つき、通常のコロニーハイブリダイゼーション法を適応して 2 種類の形質
10 転換体を選択した。常法により、これら 3 種類の形質転換体から組換え D
N A を採取する一方、配列表に於ける配列番号 29 に示すアミノ酸配列に
おける第 6 番目より第 16 番目までのアミノ酸配列に基づき 5' - T G G
A C N C A R C C N G A R G C N G G N G C N G T N T T G C A - 3' で
表わされる塩基配列のプローブ 2 を化学合成し、同様に同位体標識後、通
15 常のサザーン・ハイブリダイズを適応して、顕著な会合を示した組換え D
N A を選択し、当該形質転換体を『A G A 1』と命名した。

実験例 8-3 DNA 配列の解明

実施例 8-2 の方法で得た形質転換体『A G A 1』を常法に従い、ア
20 ンピシリンナトリウムを 100 μ g / ml 含むレーブロス培地 (pH 7.
0) に植菌し、37℃で 24 時間回転振盪培養した。培養終了後、遠心分
離により培養物から菌体を採取し、通常のアルカリー SDS 法により組換
え DNA を抽出した。この組換え DNA の塩基配列を、通常のリボキシ
法により分析したところ、当該組換え DNA は、アルスロバクター グロ
25 ビホルミス A 19 株に由来する、鎖長 5811 塩基対の、配列表に於ける
配列番号 32 に示す塩基配列の DNA を含んでいた。第 19 図に示すよう

に、この組換えDNAにおいて、当該DNAは、制限酵素Kpn Iによる認識部位の下流に連結されていた。一方、この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、その配列番号32に併記したとおりであり、このアミノ酸配列と、実験例5-1の方法で確認された本発明のポリペプチドのN末端アミノ酸配列及び実験例5-4の方法で明らかにされた中間部部分アミノ酸配列である、配列表に於ける配列番号26及び配列番号27乃至31に示すアミノ酸配列と比較したところ、配列表に於ける配列番号26に示すアミノ酸配列は、配列番号32に併記したアミノ酸配列に於ける第37乃至49番目のアミノ酸配列と完全に一致した。また、配列表における配列番号27、28、29、30、及び31に示すアミノ酸配列は、それぞれ、配列表に於ける配列番号32に併記したアミノ酸配列に於ける第227乃至239番目、第345乃至374番目、第401乃至430番目、第89乃至115番目、及び第641乃至667番目のアミノ酸配列と完全に一致した。尚、配列表に於ける配列番号32に於ける第4550乃至4552番目の塩基配列は、翻訳終止コドン（5'-TGA-3'）をコードしていることから、本発明のポリペプチドのC末端は、その直前のフェニルアラニン（配列表に於ける配列番号32に於ける第965番目のアミノ酸）であることが判明した。

これらの結果は、本発明のポリペプチドが配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有し、本発明のポリペプチドは、アルスロバクター グロビホルミスA19株（FERM B P-7590）に於いては、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。又、配列表における配列番号32に併記したアミノ酸配列における第1乃至36番目のアミノ酸配列は、当該ポリペプチドの分泌シグナル配列と推定された。これらのことから、当該ポリペプチドの分泌前の前駆体ペプチドは、配列表に於ける配列番号32に併記されたアミノ酸

配列からなり、そのアミノ酸配列は、配列表における配列番号 32 に示す塩基配列にコードされていることが判明した。このようにして、その塩基配列を確認した組換え DNA を『pAGA1』と命名した。

5 実験例 9 本発明の形質転換体によるポリペプチドの産生

実験例 9-1 形質転換体 BGC2

澱粉部分物『バインデックス #4』5 g/L、ポリペプトン 20 g/L、酵母エキス 20 g/L 及びリン酸一水素ナトリウム 1 g/L を含む水溶液を 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 入れ、オートクレーブで 120 °C で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7.0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩 10 mg を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実験例 6-2 の方法で得た形質転換体『BGC2』を接種し、27 °C で約 48 時間通気攪拌培養した。この培養物中の当該ポリペプチドの有無を調べるために、常法にしたがい、この培養物を遠心分離して培養上清と菌体とに分離して個別に回収した。菌体については、超音波破碎法による細胞からの全抽出物と、浸透圧ショック法による細胞ペリプラズムからの抽出物とを別々に調製した。前記超音波破碎法は、菌体を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した後、その菌体懸濁液を氷水中で冷却しながら超音波ホモゲナイザー (『モデル UH-600』)((株) エスエムテーク) で細胞を破碎し、その破碎物を細胞全抽出物とする方法を採用した。前記浸透圧ショック法は、菌体を 30 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) で洗浄した後、洗浄菌体を 200 g/l スクロース及び 1 mM-EDTA を含む 33 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.3) に懸濁し 27 °C で 20 分間振盪し、続いて、遠心分離して菌体を回収し、その菌体を、予め約 4 °C に冷却しておいた 0.5 mM 塩化マグネシウム水溶液に懸濁し、氷水中で 20 分間振盪して細胞ペ

リプラズムから抽出する方法を採用した。その後、遠心分離して、上清を回収し、その上清を細胞ペリプラズム抽出物とした。

- このようにして得た培養上清、細胞全抽出物、細胞ペリプラズム抽出物それぞれについて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を測定し、
- 5 それぞれの活性値を培養物 1 ml 当りに換算した。結果を表 1 2 に示す。

表 1 2

試料	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性 (単位/ml-培養物)
培養上清	0.0
細胞全抽出物	1.1
細胞ペリプラズム抽出物	1.0

- 表 1 2 の結果から明らかなように、形質転換体『BGC 2』は本発明のポリペプチドを細胞内に産生し、その大部分は細胞ペリプラズムに分泌されることが判明した。尚、第一の対照として、大腸菌『XL 2-Blue』株を、培地にアンピシリンを添加していないこと以外は全て上記形質転換体の場合と同一条件で、培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第二の対照として、バチルス グロビスポルス C 1 1 株を、アンピシリンを含有していないこと以外はすべて上記形質転換体の場合と同一条件で培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第一の対照の培養上清、菌体破砕物とも α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は全く認められなかった。第二の対照の培養上清及び菌体破砕物には α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性が認められたが、この場合は、それぞれ、培養物当り約 0.37 単位、約 0.02 単位であり、形質転換体『BGC 2』の場合に比較して明らかに低い値であった。
- 10
- 15
- 20

上記で得た細胞ペリプラズム抽出物を、更に実験例 1 の方法に準じて、

- 塩析、透析し、『セパビーズ (Sepabeads) F P - D A 1 3』ゲル、『セファクリル (Sephacryl) H R S - 2 0 0』ゲル、『ブチルトヨパール (Butyl-Toyoppearl) 6 5 0 M』ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーに供して精製し、本発明のポリペプチド
- 5 を実験例 1 に示した方法に準じて分析した。S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量約 1 3 7, 0 0 0 \pm 2 0, 0 0 0 ダルトン、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による等電点約 5. 2 \pm 0. 5、 α -イソマルトシル転移酵素活性の至適温度約 4 5 $^{\circ}\text{C}$ (Ca^{2+} イオン非存在)、約 5 0 $^{\circ}\text{C}$ (Ca^{2+} イオン存在)、至適 pH 約 6. 0、温度安定性は約 4 0 $^{\circ}\text{C}$
- 10 まで (Ca^{2+} イオン非存在)、約 5 0 $^{\circ}\text{C}$ (Ca^{2+} イオン存在)、pH 安定性は約 5. 0 乃至 1 0. 0 であった。これらの結果から、本組換え型ポリペプチドは、実験例 1 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質と実質的に同一であった。
- 15 実験例 9 - 2 形質転換体 B G N 2
- 澱粉部分物『バインデックス # 4』5 g / L、ポリペプトン 2 0 g / L、酵母エキス 2 0 g / L 及びリン酸一水素ナトリウム 1 g / L を含む水溶液を 5 0 0 m l 容三角フラスコに 1 0 0 m l 入れ、オートクレーブで 1 2 1 $^{\circ}\text{C}$ で 1 5 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7. 0 に調製した後、アン
- 20 ビシリンナトリウム塩 1 0 m g を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実験例 7 - 2 の方法で得た形質転換体『B G N 2』を接種し、2 7 $^{\circ}\text{C}$ で約 4 8 時間通気攪拌培養した。この培養物中の当該ポリペプチドの有無を調べるために、実験例 9 - 1 の方法と同様に培養上清と細胞全抽出物と細胞ペリプラズム抽出物とを別々に調製した。培養上清、細胞
- 25 全抽出物、細胞ペリプラズム抽出物それぞれについて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を測定し、それぞれの活性値を培養物 1 m l 当

りに換算した。結果を表 1 3 に示す。

表 1 3

試 料	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性 (単位 / ml - 培養物)
培養上清	0. 5 4
細胞全抽出物	0. 9 1
細胞ペリプラズム抽出物	0. 8 5

表 1 3 の結果から明らかなように、形質転換体『B G N 2』は本発明の
 5 ポリペプチドを培養上清及び細胞内に産生し、その細胞内のうちの大部分
 は細胞ペリプラズムに分泌されることが判明した。尚、第一の対照として、
 大腸菌『X L 2 - B l u e』株を、培地にアンピシリンを添加していない
 こと以外は全て上記形質転換体の場合と同一条件で、培養し、培養物から
 培養上清と菌体破砕物を調製した。第二の対照として、バチルス グロビ
 10 スポルス N 7 5 株を、アンピシリンを含有していないこと以外はすべて上
 記形質転換体の場合と同一条件で培養し、培養物から培養上清と菌体破砕
 物を調製した。第一の対照の培養上清、菌体破砕物とも α -イソマルトシ
 ルグルコ糖質生成酵素活性は全く認められなかった。第二の対照の培養上
 清及び菌体破砕物には α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性が認め
 15 られたが、この場合は、それぞれ、培養物当たり約 0. 2 1 単位、約 0. 0
 1 単位であり、形質転換体『B G N 2』の場合に比較して明らかに低い値
 であった。

上記で得た培養上清と細胞ペリプラズム抽出物との混合物を、更に実験
 例 2 の方法に準じて、塩析、透析し、『セパビーズ (S e p a b e a d s)
 20 F P - D A 1 3』ゲル、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S
 - 2 0 0』ゲル、『ブチルートヨパール (B u t y l - T o y o p e a r l)

650 M』ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーに供して精製し、本発明のポリペプチドを実験例 2 に示した方法に準じて分析した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量約 136,000 ± 20,000 ダルトン、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による等電点約 7.3 ± 0.5、 α -イソマルトシル転移酵素活性の至適温度約 50 °C (Ca^{2+} 非存在下)、約 55 °C (Ca^{2+} 存在下)、至適 pH 約 6.0、温度安定性は約 45 °C まで (Ca^{2+} 非存在下)、約 50 °C (Ca^{2+} 存在下)、pH 安定性は約 5.0 乃至 9.0 であった。これらの結果から、本組換え型ポリペプチドは、実験例 2 の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を有するポリペプチドの理化学的性質と実質的に同一であった。

実験例 9-3 形質転換体 A G A 1

澱粉部分物『バインデックス # 4』5 g / L、ポリペプトン 20 g / L、酵母エキス 20 g / L 及びリン酸一水素ナトリウム 1 g / L を含む水溶液を 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 入れ、オートクレーブで 121 °C で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7.0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩 10 mg を無菌的に添加して液体培地を調製した。この液体培地に実験例 8-2 の方法で得た形質転換体『A G A 1』を接種し、27 °C で約 48 時間通気攪拌培養した。この培養物中の当該ポリペプチドの有無を調べるために、実験例 9-1 の方法と同様に培養上清と細胞全抽出物と細胞ペリプラズム抽出物とを別々に調製した。培養上清、細胞全抽出物、細胞ペリプラズム抽出物それぞれについて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を測定し、それぞれの活性値を培養物 1 ml 当りに換算した。結果を表 14 に示す。

表 1 4

試 料	α -イソマルトシルグルコ糖質生成 酵素活性 (単位 / ml - 培養物)
培養上清	0.51
細胞全抽出物	2.5
細胞ペリプラズム抽出物	2.4

表 1 4 の結果から明らかなように、形質転換体『A G A 1』は本発明のポリペプチドを培養上清及び細胞内に産生し、その細胞内のうちの大部分は細胞ペリプラズムに分泌されることが判明した。尚、第一の対照として、大腸菌『X L 2 - B l u e』株を、培地にアンピシリンを添加していないこと以外は全て上記形質転換体の場合と同一条件で、培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第二の対照として、アルスロバクターグロビホルミス A 1 9 株を、アンピシリンを含有していないこと以外はすべて上記形質転換体の場合と同一条件で培養し、培養物から培養上清と菌体破砕物を調製した。第一の対照の培養上清、菌体破砕物とも α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は全く認められなかった。第二の対照の培養上清及び菌体破砕物には α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性が認められたが、この場合は、それぞれ、培養物当り約 0.33 単位、約 0.01 単位であり、形質転換体『A G A 2』の場合に比較して明らかに低い値であった。

上記で得た培養上清と細胞ペリプラズム抽出物との混合物を、更に実験例 3 の方法に準じて、塩析、透析し、『D E A E - トヨパール (T o y o p e a r l) 6 5 0 M』ゲル、『セファクリル (S e p h a c r y l) H R S - 2 0 0』ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーに供して精製し、本発明のポリペプチドを実験例 3 に示した方法に準じて分析した。S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量約 94,000 \pm 20,000

00ダルトン、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による等電点約
4.3±0.5、 α -イソマルトシル転移酵素活性の至適温度約60℃(Ca²⁺非存在下)、約65℃(Ca²⁺存在下)、至適pH約8.4、温度安定
性は約55℃まで(Ca²⁺非存在下)、約60℃(Ca²⁺存在下)、pH安
5 定性は約5.0乃至9.0であった。これらの結果から、本組換え型ポリ
ペプチドは、実験例3の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵
素活性を有するポリペプチドの理化学的性質と実質的に同一であった。

これらの結果から、本発明のポリペプチドは、組換えDNA技術によっ
て製造できると共に、ポリペプチドの生産性も著しく向上することが判明
10 した。

以下、実施例により、本発明のポリペプチドの製造方法と、本発明のポリ
ペプチドを用いた環状四糖又はそれを含む糖質の製造方法について具
体的に説明する。

15 実施例1 本発明のポリペプチドの製造

澱粉部分物『バインデックス#4』5g/L、ポリペプトン20g/L、
酵母エキス20g/L及びリン酸一水素ナトリウム1g/Lを含む水
溶液を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで1
21℃で15分間処理し、冷却し、無菌的にpH7.0に調製した後、ア
ンピシリンナトリウム塩を100 μ g/ml加えた。この液体培地に実験
20 例5-2の方法で得た形質転換体『BGC2』を接種し、27℃、230
rpmで24時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、30l容フ
ァーメンターに上記と同じ組成の液体培地を約18lとり、同様に滅菌し、
37℃まで冷却後、アンピシリンナトリウム塩を50 μ g/ml加え、種
25 培養液を1%(v/v)接種し、27℃で48時間通気培養した。培養物
を遠心分離して菌体を回収し、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸

濁した後、超音波処理して菌体を破碎し、遠心分離により不溶物を除去して上清を得た。この上清中の酵素活性を測定したところ、培養物 1 l 当り、約 1, 100 単位の酵素活性が検出された。この上清を用いて実験例 1 の方法により精製したところ、比活性約 13.5 単位/mg 蛋白質の本発明のポリペプチドを 1 ml 当り約 61 単位含む水溶液が約 70 ml 得られた。

実施例 2 本発明のポリペプチドの製造

澱粉部分物『バインデックス #4』5 g/L、ポリペプトン 20 g/L、酵母エキス 20 g/L 及びリン酸一水素ナトリウム 1 g/L を含む水溶液を 500 ml 容三角フラスコに 100 ml 入れ、オートクレーブで 121℃ で 15 分間処理し、冷却し、無菌的に pH 7.0 に調製した後、アンピシリンナトリウム塩を 100 µg/ml 加えた。この液体培地に実験例 6-2 の方法で得た形質転換体『BGN2』を接種し、37℃、230 rpm で 24 時間回転振盪培養して種培養液を得た。次に、30 l 容フーメンターに上記と同じ組成の液体培地を約 18 l とり、同様に滅菌し、27℃ まで冷却後、アンピシリンナトリウム塩を 50 µg/ml 加え、種培養液を 1% (v/v) 接種し、27℃ で 48 時間通気培養した。培養物を遠心分離して培養上清を得た。この培養上清中の酵素活性を測定したところ、培養物 1 L 当り、約 750 単位の酵素活性が検出された。この上清を用いて実験例 2 の方法により精製したところ、比活性約 12.6 単位/mg 蛋白質の本発明のポリペプチドを 1 ml 当り約 72 単位含む水溶液が約 75 ml 得られた。

実施例 3 環状四糖を含むシラップ状物の製造

タピオカ澱粉を濃度約 25% 澱粉乳とし、これに α-アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業（株）製）を澱粉固形物グラム当

り 0.2% 加え、85 乃至 90℃ で約 20 分間反応させ、次いで 120℃ に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃ に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに実施例 1 の方法で得た本発明のポリペプチドと、実験例 1-4 の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素を澱粉固形物グラム当りそれぞれ 2.2 単位と 6.6 単位の割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ ((株) 林原生物化学研究所製) を澱粉固形物グラム当り 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35℃ で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃ に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤 (商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬 (株) 製) を固形物 1 グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤 (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業 (株) 製) を固形物 1 グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃ に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 60% の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約 90% で得た。

本シラップは、固形物当り、グルコース 38.4%、環状四糖 58.1%、その他の糖質を 3.5% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

実施例 4 環状四糖結晶性粉末の製造

とうもろこし澱粉を濃度約 20% の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム 0.1% 加え、pH 6.5 に調整し、 α -アミラーゼ (商品名『ターマミ

ール 60 L』、ノボ社製)を澱粉グラム当たり 0.3% 加え、95℃で 15 分間反応させ、次いで 120℃に 20 分間オートクレーブし、更に約 35℃に急冷して DE 約 4 の液化溶液を得、これに実施例 1 の方法で得たポリペプチドと実験例 1-4 の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素を澱粉固
5 形物グラム当りそれぞれ 2.5 単位と 7.0 単位の割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ((株)林原生物化学研究所製)を澱粉固形物グラム当り 10 単位になるように加え、pH 6.0、温度 35 で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃に調整した後、 α -グルコシダー
10 ゼ剤(商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬(株)製)を固形物グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤(商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業(株)製)を固形物グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従っ
15 て、活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して、固形物当り、グルコース 34.2%、環状四糖 62.7%、その他の糖質を 3.1% 含有する濃度 60% の環状四糖含有シラップを得た。

この環状四糖含有シラップを、強酸性カチオン交換樹脂(商品名『アン
20 バーライト CR-1310 (Na 型)』、オルガノ(株)製)を用いたカラム分画を行なった。樹脂を内径 5.4 cm のジャケット付きステンレス製カラム 4 本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長 20 m とした。カラム内温度 60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して 5% (v/v) 加え、これに 60℃の温水を SV 0.13 で流して分画し、溶出液の糖組成を HPLC
25 法でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、固形物当たり約 98% の環状四糖を含有する環状四糖高含有液を得た。

本溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として環状四糖5乃至6含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥搭上のノズルより150kg/cm²の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥搭の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥搭外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成搭に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、原料澱粉固形物当たり収率約20%で環状四糖5乃至6含水結晶粉末を得た。

- 10 本品は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

実施例5 環状四糖結晶性粉末の製造

- とうもろこし澱粉を濃度約30%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム0.1%加え、pH6.5に調整し、 α -アミラーゼ（商品名『ターマミール60L』（ノボ社製）を澱粉グラム当たり0.3%加え、95℃で15分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約51℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実施例2の方法で得たポリペプチドと実験例2-4の方法で得た α -イソマルトシル転移酵素を澱粉固形物グラム当たりそれぞれ2.4単位と8.0単位の割合加え、更にシクロマルトデキストリン・グルカノトランスフェラーゼ（（株）林原生物化学研究所製）を澱粉固形物グラム当たり3単位になるように加え、pH5.5、

温度 51℃ で 48 時間反応させた。その反応液を 95℃ で 30 分間保った後、pH 5.0、温度 50℃ に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬（株）製）を固形物グラム当たり 300 単位加え、24 時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業（株）製）を固形物グラム当たり 30 単位加え、17 時間反応させ、その反応液を 95℃ に加熱し 30 分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を常法に従って活性炭で脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して、固形物当り、グルコース 46.8%、環状四糖 44.0%、その他の糖質を 9.8% 含有する濃度 60% の環状四糖含有シラップを得た。得られた環状四糖含有シラップを原糖液とし、環状四糖の含量を高めるため、実施例 5 の方法に準じて強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行なって、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、濃縮し、噴霧乾燥して、環状四糖含有粉末を原料澱粉固形物当たり収率約 45% で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 3.7%、環状四糖 80.5%、及びその他の糖質を 15.8% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

本発明は斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義ある発明と言える。

請 求 の 範 囲

1. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく
5 α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する酵素活性を有し、かつ、配列表に於ける配列番号1、2、若しくは3に示すアミノ酸配列、若しくはそれらのアミノ酸配列に於いて、1若しくは
10 複数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加したアミノ酸配列を有するポリペプチド。

2. 下記の理化学的性質を有する請求の範囲第1項記載のポリペプチド。

(1) 分子量

S D S -ゲル電気泳動法により、約74,000乃至約160,000
15 ダルトンの範囲内に分子量を有する。

(2) 至適温度

pH 6.0、60分間反応の条件下、約40乃至約50℃の温度範囲内に至適温度を有する。

pH 6.0、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約4
20 5乃至約55℃の温度範囲内に至適温度を有する。

pH 8.4、60分間反応の条件下、60℃に至適温度を有する。または、

pH 8.4、60分間反応の条件下において、1mM Ca^{2+} 存在下、約6
5℃に至適温度を有する。

25 (3) 至適 pH

35℃、60分間反応の条件下、pH 約6.0乃至8.4の温度範囲内

に至適 pH を有する。

(4) 温度安定性

pH 6.0、60 分間保持する条件下、約 45°C 以下に温度安定域を有する。

- 5 pH 6.0、60 分間保持する条件において、1 mM Ca^{2+} 存在下、約 60°C 以下に温度安定域を有する。

pH 8.0、60 分間反応の条件下、55°C 以下に温度安定域を有する。

または、

- 10 pH 8.0、60 分間保持する条件において、1 mM Ca^{2+} 存在下、約 60°C 以下に温度安定域を有する。

(5) pH 安定性

4°C、24 時間保持する条件下、pH 約 5.0 乃至約 10.0 の範囲内に安定 pH 域を有する。

- 15 3. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載のポリペプチドをコードする DNA。

4. 配列表に於ける配列番号 4、5、若しくは 6 に示す塩基配列若しくはそれらの塩基配列に於いて、1 若しくは複数個の塩基が欠失、置換、若しくは付加した塩基配列、又は、それらに相補的な塩基配列若しくはそれらの塩基配列に於ける 1 若しくは複数個の塩基を、遺伝子の縮重に基づき、
20 それがコードするアミノ酸配列を変えことなく他の塩基で置換した塩基配列を有する請求の範囲第 3 項記載の DNA。

5. 遺伝子の縮重に基づき、配列表における配列番号 1、2 又は 3 に示すアミノ酸配列を変えことなく、配列表における配列番号 4、5、若しくは 6 に示す塩基配列における塩基の 1 若しくは複数個の塩基を他の塩基で置換した塩基配列を有する請求の範囲第 3 項又は第 4 項記載の DNA。
25

6. バチルス属の微生物に由来する請求の範囲第 3 項、第 4 項又は第 5

項記載のDNA。

7. アルスロバクター属の微生物に由来する請求の範囲第3項、第4項又は第5項記載のDNA。

8. 請求の範囲第3項乃至第7項のいずれかに記載のDNAと、自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

9. 自律複製可能なベクターがプラスミドベクター Bluescript II SK (+) である請求の範囲第8項記載の複製可能な組換えDNA。

10. 請求の範囲第8項又は第9項記載の複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

11. 宿主が大腸菌である請求の範囲第10項記載の形質転換体。

12. 請求の範囲第10項又は第11項記載の形質転換体を栄養培地中で培養し、その培養物から請求項1又は2記載のポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドの製造方法。

13. 培養物中の請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチドを、遠心分離、濾過、濃縮、塩析、透析、分別沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動及び等電点電気泳動から選ばれる1種又は2種以上の方法により採取することを特徴とする請求項12記載のポリペプチドの製造方法。

14. 請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチドを、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質に作用させ、前記糖質の還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成さ

せる方法。

1 5. 請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチドを、非還元末端
の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が
2以上の糖質に作用させ、前記糖質の還元力を実質的に増加することなく
5 α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として $\alpha-1,$
6 グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1,$
1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質の製造方
法。

1 6. 請求の範囲第1項又は第2項記載のポリペプチドを、非還元末端
10 の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が
2以上の糖質に作用させ、前記糖質の還元力を実質的に増加することなく
 α -グルコシル転移することによって、非還元末端の結合として $\alpha-1,$
6 グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1,$
1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成さ
15 せ、次いで、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有
し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有す
るグルコース重合度が3以上の糖質から、 α -イソマルトシル転移するこ
とによって、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 3$)-
 α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 6$)- α -D-グルコピラノシル-(1
20 $\rightarrow 3$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow$)の構造を有する環状四糖を生
成する酵素を作用させて、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-
($1 \rightarrow 3$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow 6$)- α -D-グルコピ
ラノシル-($1 \rightarrow 3$)- α -D-グルコピラノシル-($1 \rightarrow$)の構造を有す
る環状四糖を生成させ、これを採取することを特徴とする環状四糖の製造
25 方法。

1 7. 環状四糖を結晶化させる工程を含むことを特徴とする請求の範囲

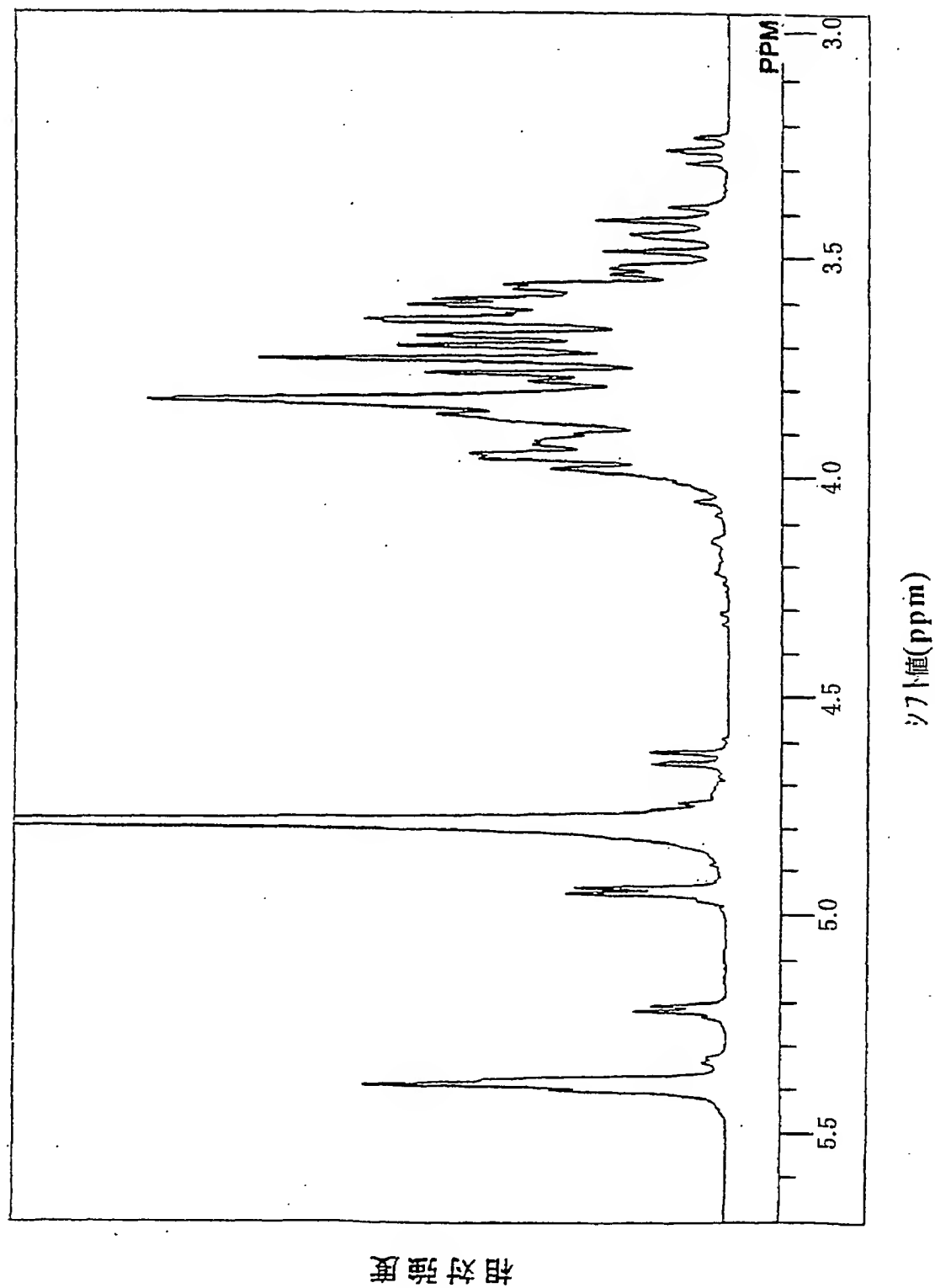
第 1 6 項記載の環状四糖の製造方法。

1 8. 環状四糖がシラップ又は結晶であることを特徴とする請求の範囲

第 1 6 項又は第 1 7 項記載の環状四糖の製造方法。

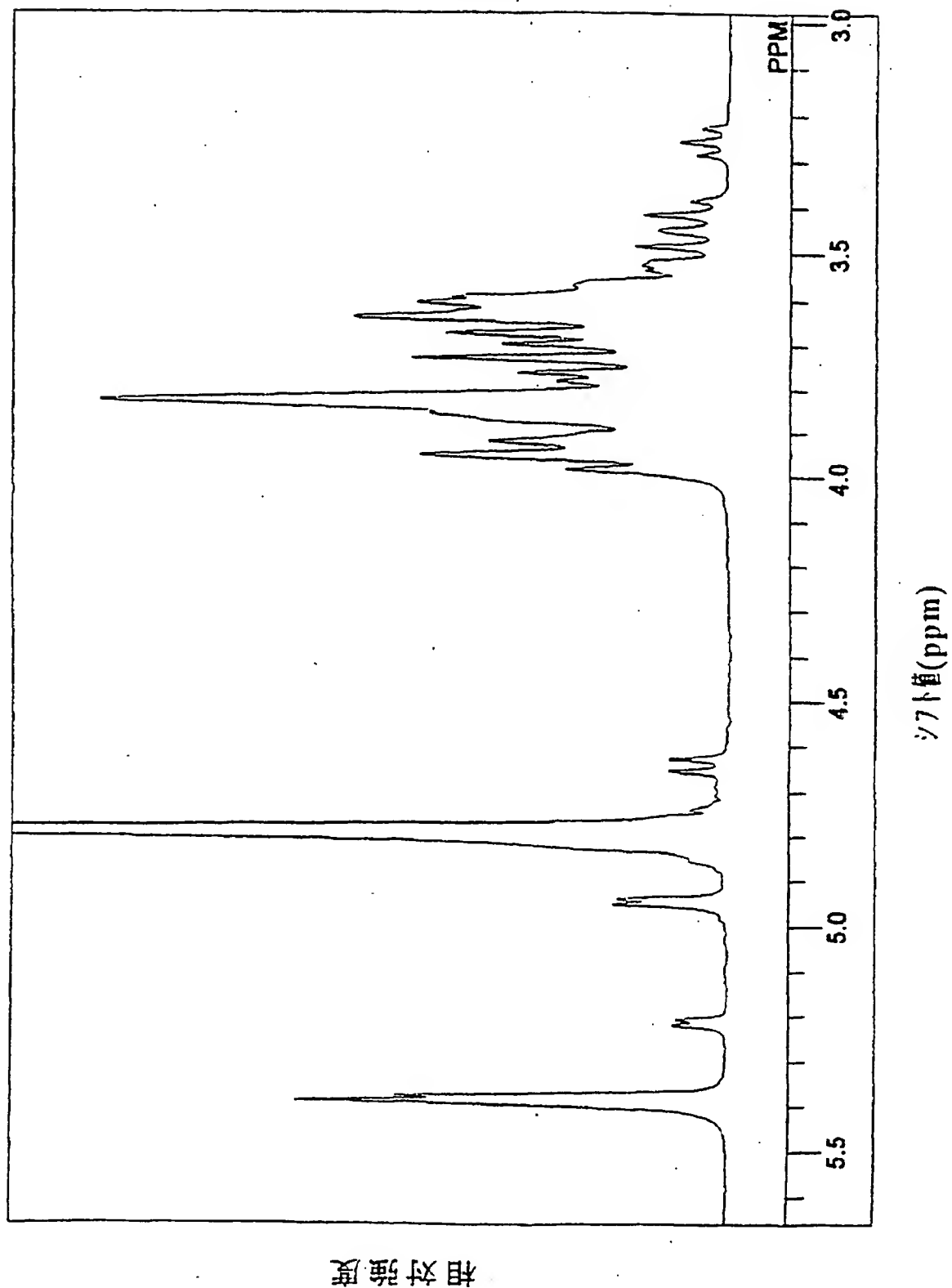
1 / 13

第 1 図



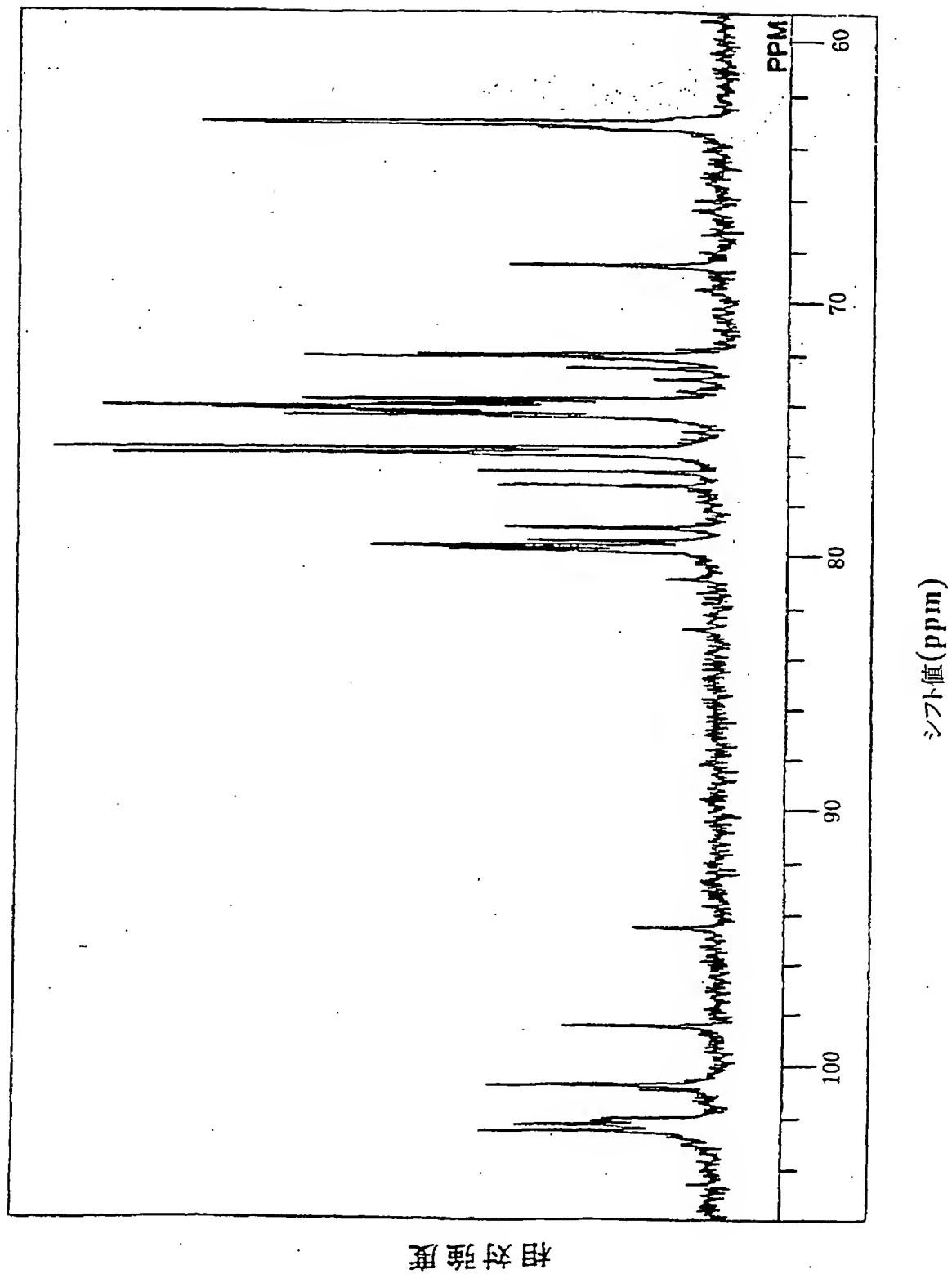
2 / 13

第2図

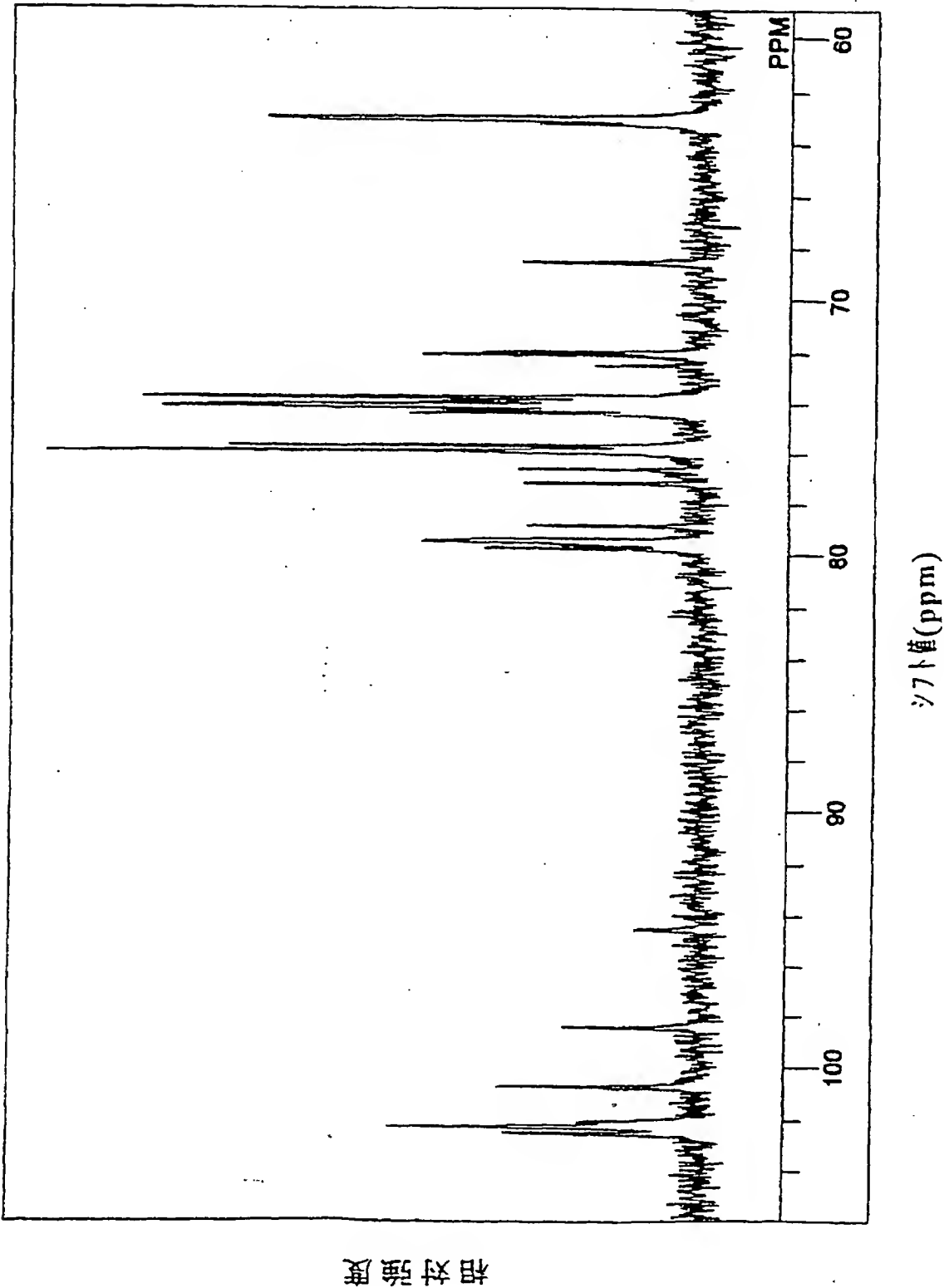


3 / 13

第3図

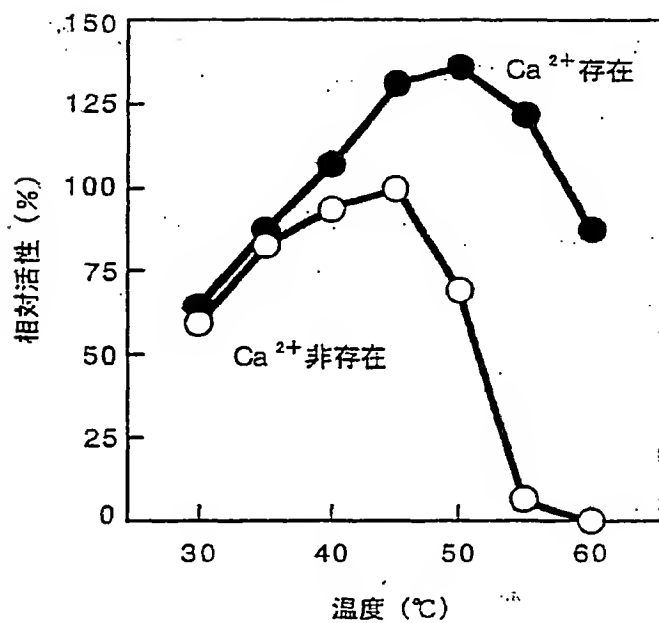


第4図

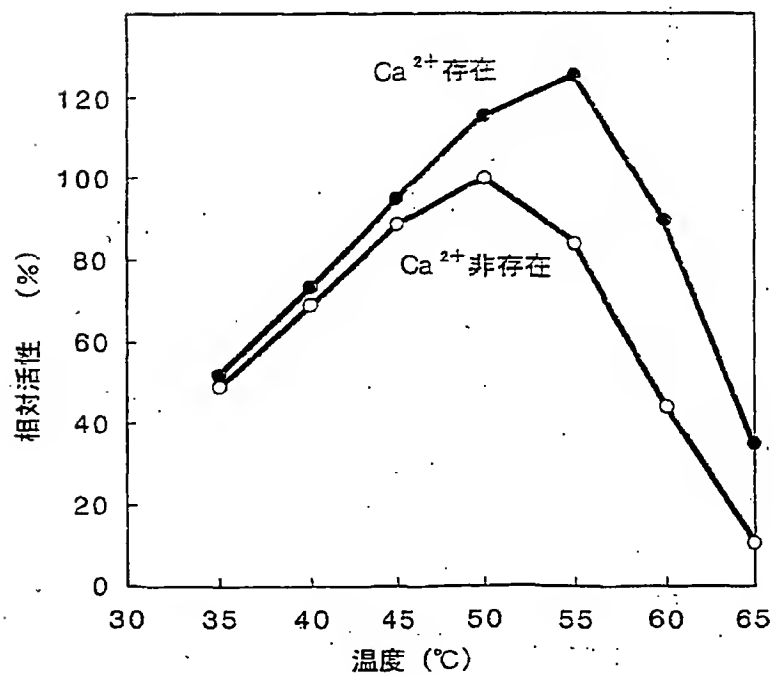


5 / 13

第5図

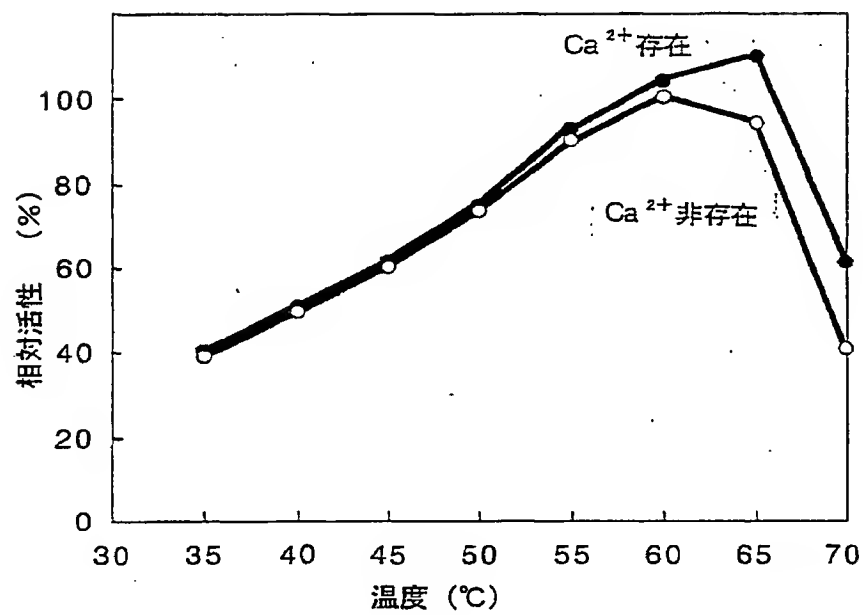


第6図

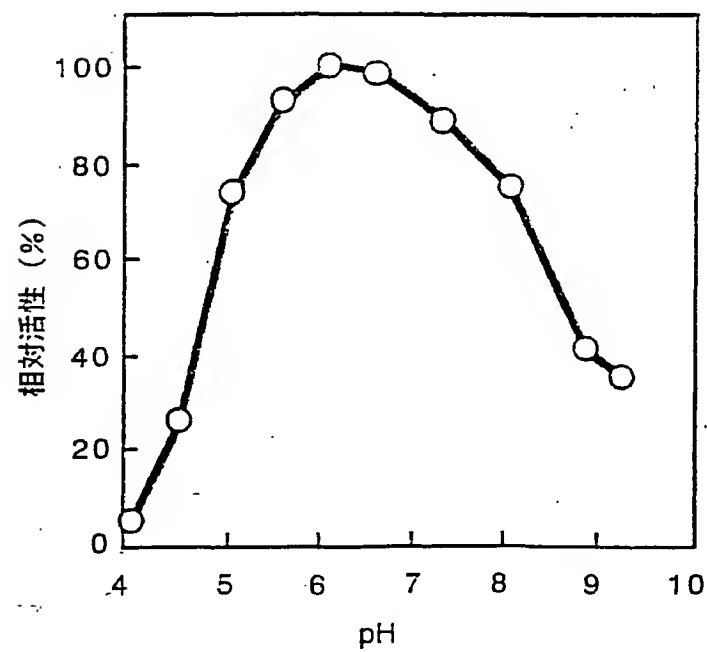


6 / 13

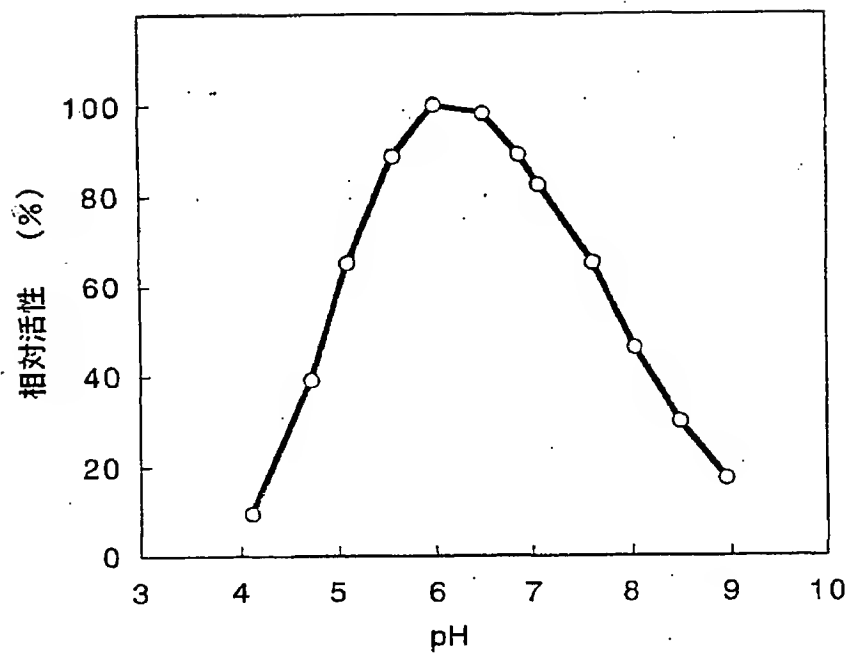
第7図



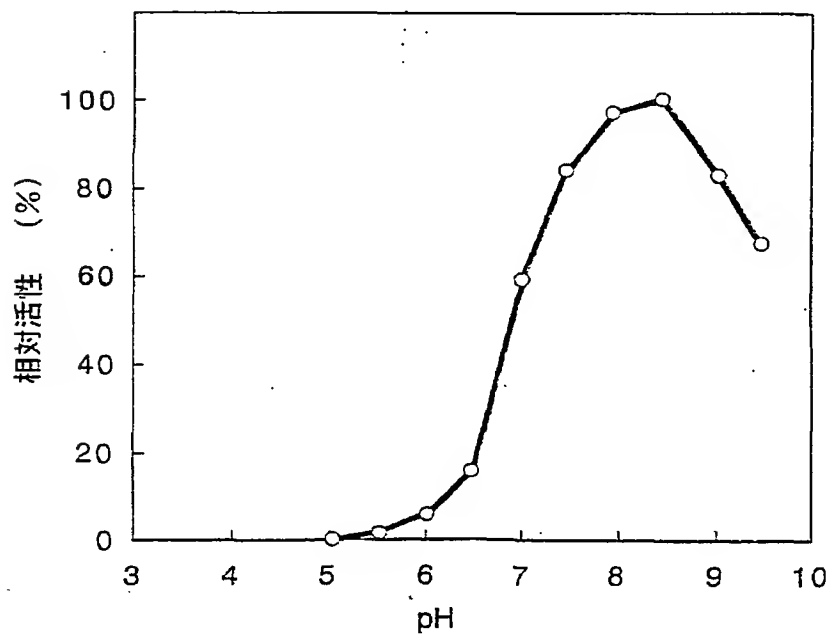
第8図



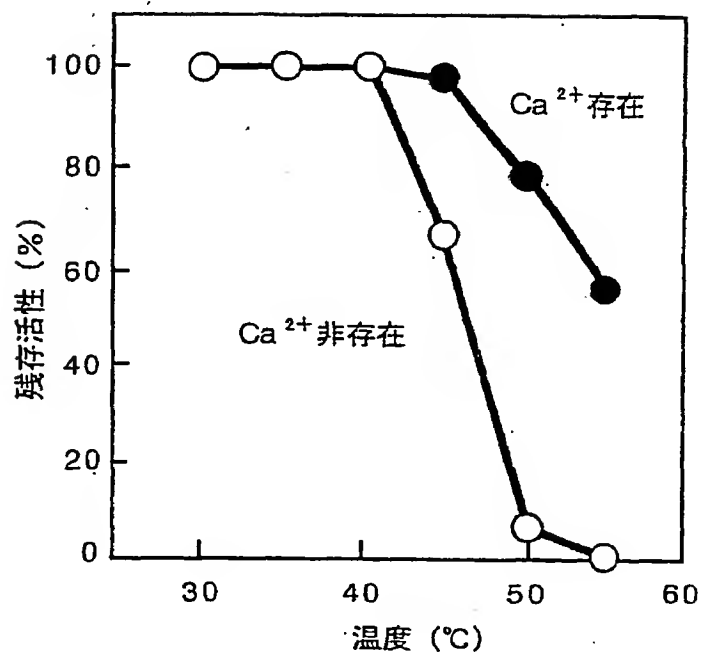
第9図



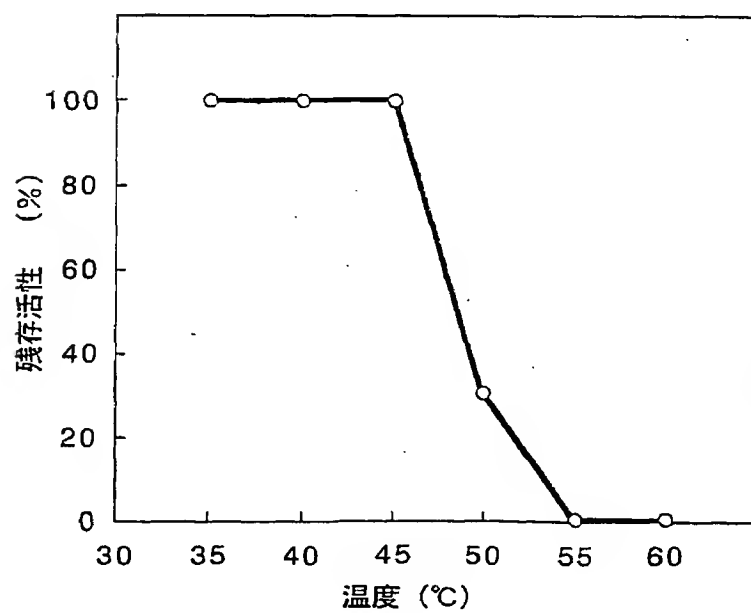
第10図



第11図

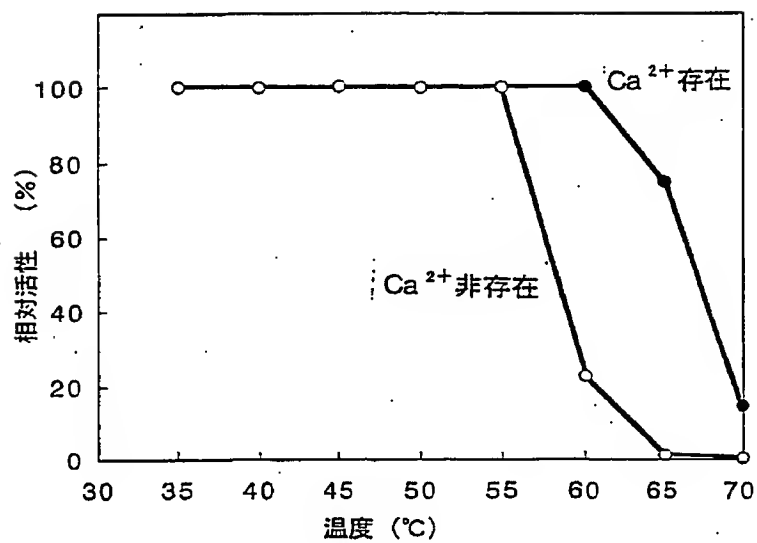


第12図

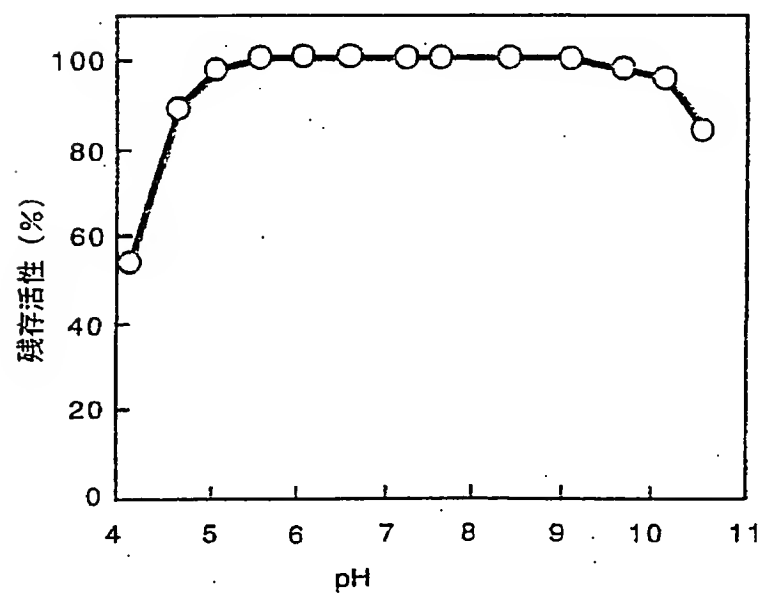


9/13

第13図

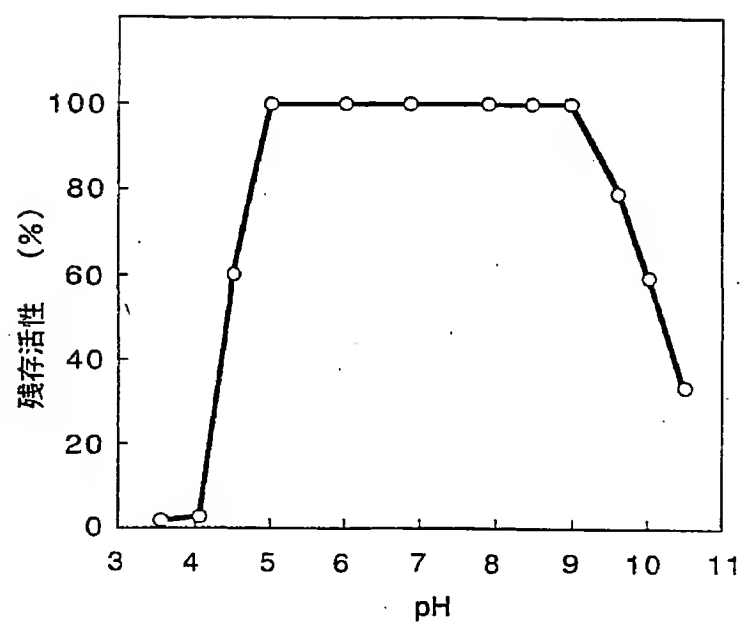


第14図

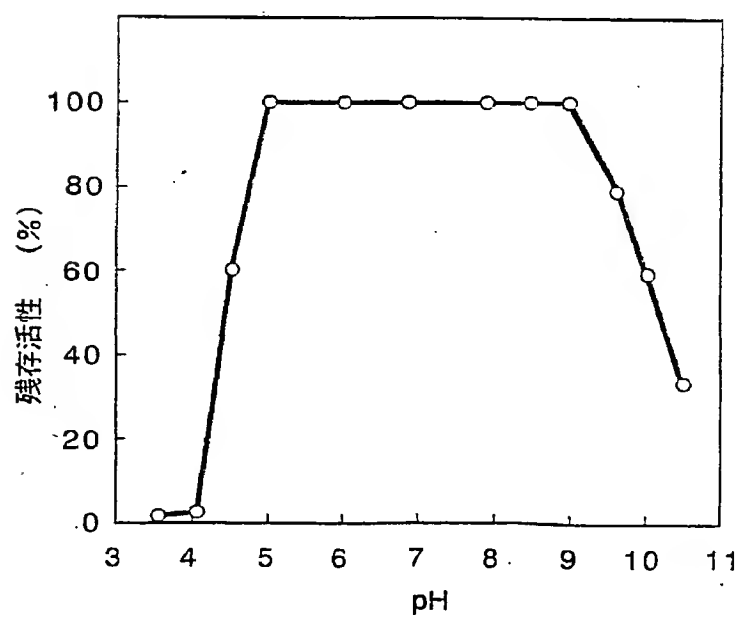


10/13

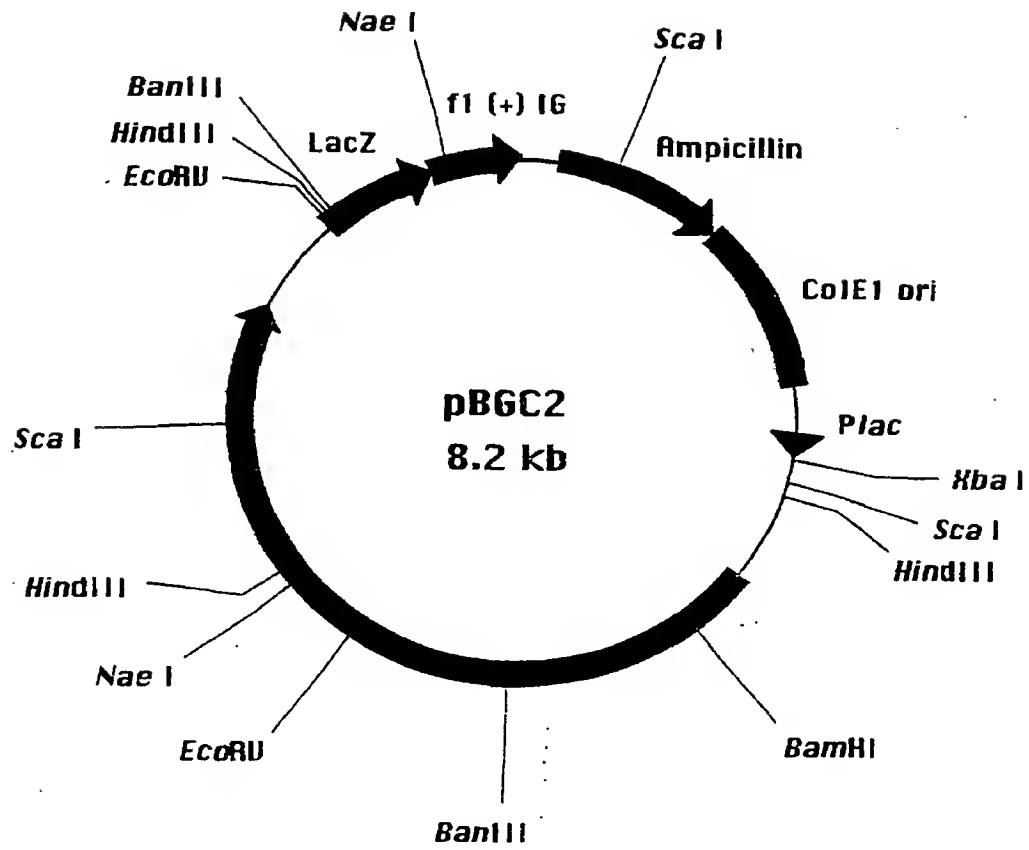
第15図



第16図

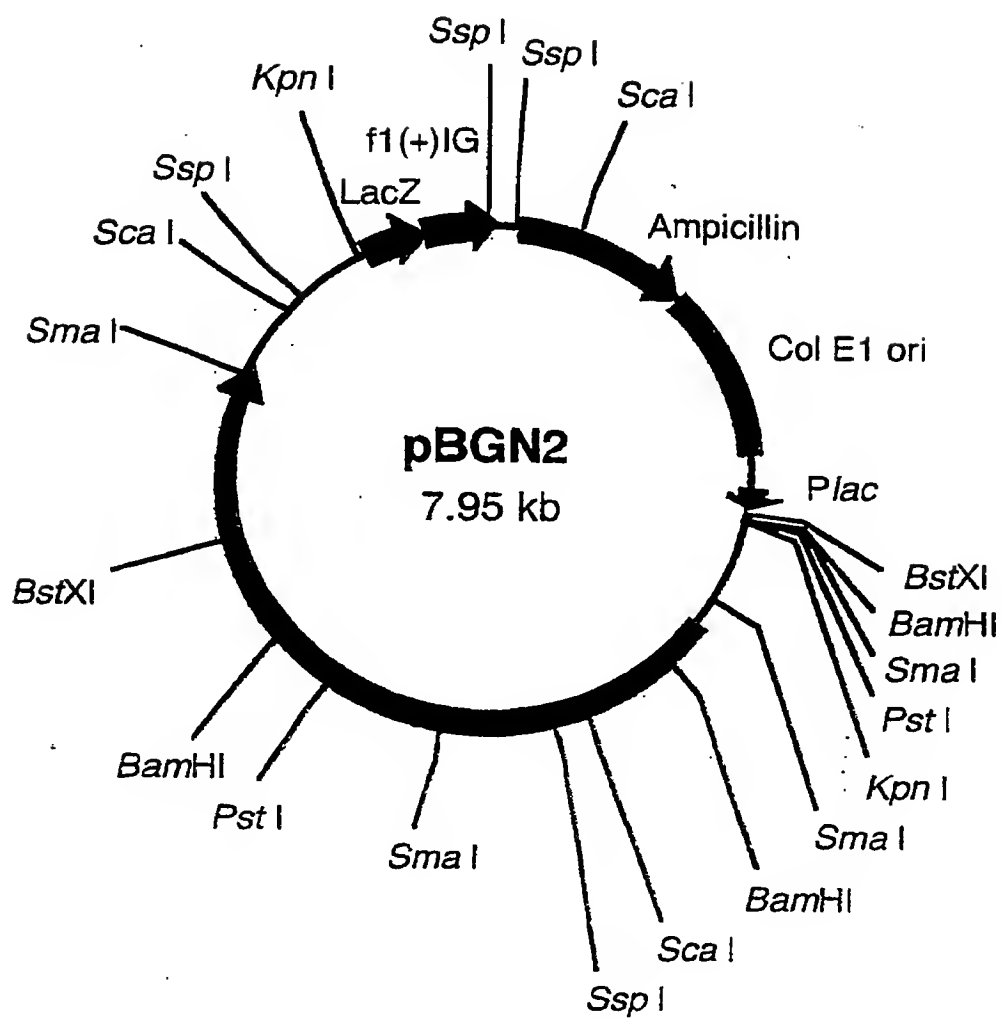


第 17 図

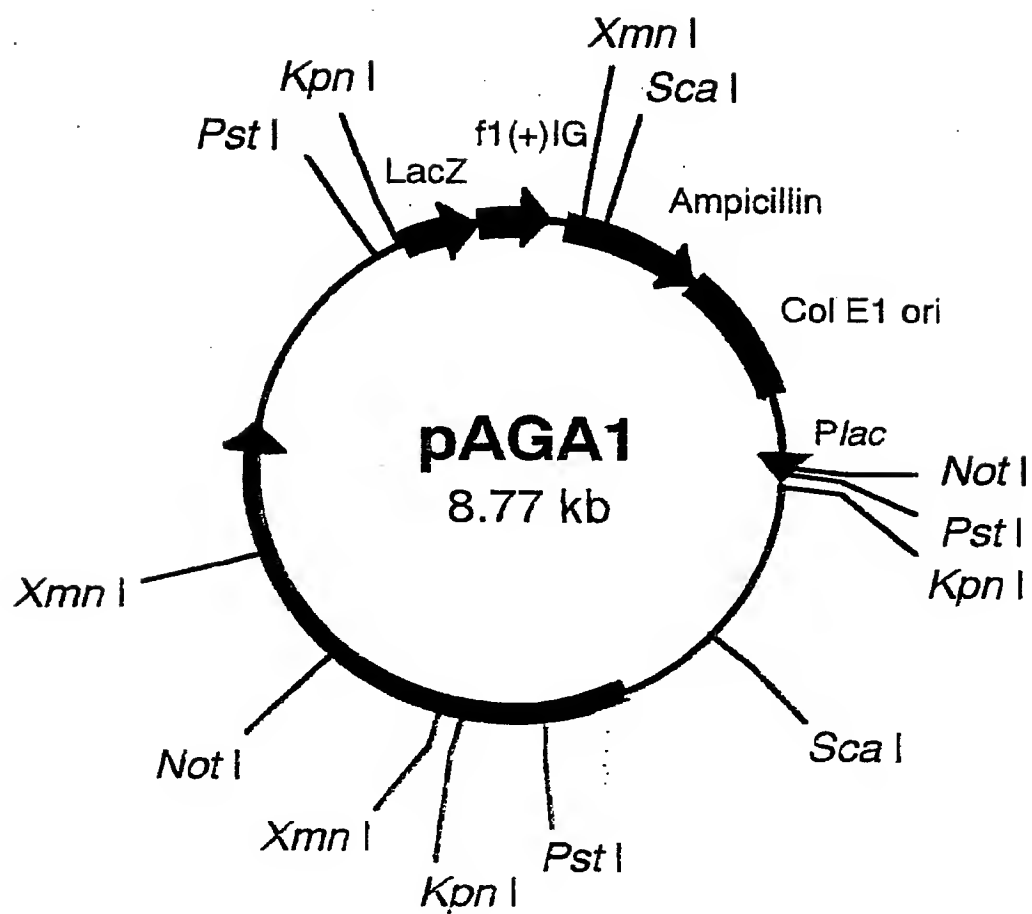


12 / 13

第18図



第 19 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N9/10, C12N9/42, C12N1/21,
C12P19/00//A23L1/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N9/10, C12N9/42, C12N1/21, C12P19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5889179 A (The United States of America, as represented by the Secretary of Agriculture), 03 May, 1999 (03.05.99), (Family: none)	1-18
P, A	JORK NOLLING et al. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium <i>Clostridium acetobutylicum</i> . Journal of Bacteriology August 2001, Vol.183, No.16, pages 4823 to 4838	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 April, 2002 (16.04.02)

Date of mailing of the international search report
23 April, 2002 (23.04.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/00052

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N9/10, C12N9/42, C12N1/21, C12P19/00
//A23L1/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/31, C12N9/10, C12N9/42, C12N1/21, C12P19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5889179 A (The United States of America, as represented by the Secretary of Agriculture) 1999.05.03 (ファミリーなし)	1-18
PA	JORK NOLLING et al. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium <i>Clostridium acetobutylicum</i> . JOURNAL OF BACTERIOLOGY August 2001, Vol. 183, No. 16, p. 4823-4838	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.04.02

国際調査報告の発送日

23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448